

**EFEK PREVENTIF ISOLAT KASEIN YOGHURT SUSU  
KAMBING TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA  
(MDA) DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI LAMBUNG  
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG DIPAPAR  
2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**MUHAMMAD HABIBIE ROBBIE**

**145130107111002**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

**EFEK PREVENTIF ISOLAT KASEIN YOGHURT SUSU  
KAMBING TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA  
(MDA) DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI LAMBUNG  
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG DIPAPAR  
2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:  
**MUHAMMAD HABIBIE ROBBIE**  
**145130107111002**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**  
**EFEK PREVENTIF ISOLAT KASEIN YOGHURT SUSU**  
**KAMBING TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA**  
**(MDA) DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI LAMBUNG**  
**TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG DIPAPAR**  
**2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)**

Oleh:

**MUHAMMAD HABIBIE ROBBIE**  
**NIM. 145130107111002**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada 17 Juli 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh  
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

**Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS.**  
NIP. 195204121980021001

**drh. Ajeng Erika PH, M.Si**  
NIP. 198905162015042001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES  
NIP. 19600903 198802 2 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Habibie Robbie

NIM : 145130107111002

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

**Efek Preventif Isolat Kasein Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Gambaran Histopatologi Lambung Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar 2,3,7,8- tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin (TCDD)**

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, makasaya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 17 Juli 2018

Yang menyatakan,

Muhammad Habibie Robbie



**EFEK PREVENTIF ISOLAT KASEIN YOGHURT SUSU KAMBING  
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI LAMBUNG TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)  
YANG DIPAPAR 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)**

**ABSTRAK**

Dioksin merupakan senyawa toksik yang termasuk dalam senyawa organoklorin bersifat sangat reaktif dan menghasilkan radikal bebas yang dapat merusak sel lambung. 2,3,7,8-Tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD) merupakan jenis dioksin yang memiliki toksisitas paling tinggi. Kasein yoghurt susu kambing memiliki potensi sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan mengetahui efek preventif pemberian yoghurt susu kambing terhadap paparan dioksin yang diamati kadar malondialdehida (MDA) dan gambaran histopatologi lambung. Penelitian bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dibagi 6 kelompok, yaitu kelompok normal, kontrol kasein (kasein yoghurt susu kambing dosis 600 mg/kg BB), kontrol positif (TCDD dosis 100 ng/kg BB), perlakuan 1 (kasein yoghurt susu kambing 300 mg/kg BB dan TCDD 100 ng/kg BB), perlakuan 2 (kasein yoghurt susu kambing 600 mg/kg BB dan TCDD 100 ng/kg BB), dan perlakuan 3 (kasein yoghurt susu kambing 900 mg/kg BB dan TCDD 100 ng/kg BB). Kadar MDA lambung diukur menggunakan metode uji Thiobarbituric Acid (TBA) dengan pengukuran spektrofotometri UV-Vis panjang gelombang 530 nm dan gambaran histopatologi lambung menggunakan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) diamati berupa kerusakan sel mukosa lambung. Kadar MDA lambung dianalisis menggunakan uji statistik *one way* ANOVA,  $\alpha=5\%$  dan analisis histopatologi lambung diolah secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan kasein yoghurt susu kambing dengan dosis 600 dan 900 mg/kgBB merupakan dosis terbaik dalam mencegah kenaikan kadar MDA lambung dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) terpapar TCDD secara signifikan ( $p<0,01$ ), dan dosis 900mg/kgBB mencegah terjadi erosi sel mukosa lambung. Kesimpulan penelitian yaitu pemberian kasein yoghurt susu kambing mampu mencegah kenaikan kadar MDA dan terjadi erosi sel mukosa lambung akibat TCDD.

**Kata kunci:** Dioksin, Kasein yoghurt susu kambing, Lambung, MDA, Gambaran histopatologi

**THE PREVENTIVE EFFECT OF ISOLATE CASEIN YOGHURT MILK  
TO MALONDIALDEHYDE (MDA) LEVEL AND HISTOPATOLOGY  
PICTURE OF GASTRIC IN (*Rattus norvegicus*) EXPOSED TO  
2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-*p*-dioxin (TCDD)**

**ABSTRACT**

Dioxins are toxic compounds belonging to organochlorine compounds are highly reactive and produce free radicals that can damage stomach cells. 2,3,7,8-Tetrachlorinedibenzo-*p*-dioxin (TCDD) is the type of dioxin that has the highest toxicity. Casein goat milk yoghurt has the potential as an antioxidant. This study aims to determine the preventive effect of goat milk yoghurt on exposure to dioxin observed levels of *malondialdehyde* (MDA) and gastric histopathology. Experimental research using Completely Randomized Design (RAL). The white rats (*Rattus norvegicus*) were divided into 6 groups, the normal group, casein control (goat milk yoghurt dose 600 mg / kg BW), positive control (TCDD dose 100 ng / kg BW), treatment 1 (goat milk yoghurt 300 mg / kg BW and TCDD 100 ng / kg BW), treatment 2 (goat milk yoghurt 600 mg / kg BW and TCDD 100 ng / kg BW), and treatment 3 (goat milk yoghurt 900 mg / kg BW and TCDD 100 ng / kg BW). Gastric MDA levels were measured using the Thiobarbituric Acid (TBA) assay method with 530 nm wavelength UV-Vis spectrophotometric measurement and gastric histopathology using Hematoxylin Eosin (HE) staining observed in the form of gastric mucosal cell damage. Gastric MDA levels were analyzed using one way ANOVA statistical test,  $\alpha = 5\%$  and gastric histopathology analysis was descriptively processed. The results showed that goat milk yoghurt with dose of 600 and 900 mg / kgBW was the best dose in preventing the increase of MDA level of gastric from white rat (*Rattus norvegicus*) exposed TCDD significantly ( $p < 0,01$ ), and dose 900mg / kgBW prevented erosion of gastric mucosal cells. The conclusion of this research is giving goat milk goat yoghurt able to prevent the increase of MDA level and erosion of gastric mucosal cells caused by TCDD.

**Keyword:** Dioxin, Casein goat milk yoghurt, Gastric, MDA, Gastric histopathology

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala rahmat dan nikmat-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Efek Preventif Isolat Kasein Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar *Malondialdehida* (MDA) dan Gambaran Histopatologi Lambung Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar 2,3,7,8- *tetrachloro-dibenzo-p-dioxin* (TCDD)**”. Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya (FKH UB).

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS., selaku Pembimbing I atas segala bantuan, bimbingan, kesabaran, nasihat, waktu, dan arahan yang diberikan kepada penulis.
2. drh. Ajeng Erika P.H., M.Si., selaku Pembimbing II atas segala bantuan, bimbingan, kesabaran, nasihat, waktu, dan arahan yang diberikan kepada penulis.
3. drh. Aldila Noviatry, M.Biomed, dan drh. Mira Fatmawati, M.Si., sebagai dosen penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan saran yang membangun.
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES., selaku Dekan FKH UB atas kepemimpinan dan dukungan demi kemajuan FKH UB.
5. Bapak, Ibu, dan Kakak tercinta yang terus memberikan doa, motivasi, kasih sayang, serta materi kepada penulis.

6. Malinda Irawan dan Melinda Puspita Sari selaku anggota kelompok penelitian yang telah berjuang bersama.
7. Gabriela, Gaviota, dan Dena terimakasih atas segala dukungan, bantuan, dan doa yang tidak akan terlupakan kepada penulis.
8. Kepada Malinda Irawan sebagai sahabat, pendamping hidup, dan teman hidup yang selalu mendukung untuk selalu memberikan semangat dan motivasi.
9. Teman – teman lanangan AMAZE untuk setiap bantuan dan hiburan yang diberikan kepada penulis.
10. Teman-teman AMAZE dan AVENGERS yang mengisi hari-hari penulis dengan keceriaan,
11. Teman-teman Asisten Embriologi yang tidak pernah lelah untuk meluangkan waktu di laboratorium.
12. Teman-teman seperjuangan Kolega FKH UB angkatan 2014, adik tingkat, dan kakak tingkat yang selalu memberikan bantuan tenaga dan pikiran.
13. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini penulis merasa masih banyak kekurangan pada teknis penulisan maupun materi, mengingat akan kemampuan yang dimiliki penulis. Skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, sehingga diharapkan dapat memberikan masukan dari berbagai pihak untuk penulisan yang lebih baik. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat karena pengalaman adalah guru terbaik.

Malang, 17 Juli 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>ABSTRAK</b> .....	v
<b>ABSTRAK</b> .....	vi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiii
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH</b> .....	xiv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Batasan Masalah.....	6
1.4 Tujuan Penelitian .....	8
1.5 Manfaat Penelitian .....	8
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	9
2.1 Kasein Yoghurt Susu Kambing .....	9
2.2 Dioksin / 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD) .....	12
2.3 Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	19
2.4 Lambung .....	21
2.5 Radikal Bebas .....	23
2.6 Malondialdehida (MDA) .....	25
2.7 Antioksidan .....	27
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....	29
3.1 Kerangka Teori .....	29
3.2 Hipotesis Penelitian .....	33
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	34
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	34
4.2 Materi Penelitian .....	34
4.2.1 Alat .....	34
4.2.2 Bahan .....	35
4.3 Tahapan Penelitian .....	35

4.3.1 Rancangan Penelitian .....	35
4.3.2 Variabel Penelitian .....	37
4.4 Prosedur Kerja .....	37
4.4.1 Pembuatan Kasein .....	37
4.4.1.1 Pembuatan Starter Cair ( <i>Mother Culture</i> ).....	37
4.4.1.2 Pembuatan Yoghurt .....	38
4.4.1.3 Pembuatan Kasein Yoghurt Susu Kambing.....	38
4.4.2 Persiapan Hewan Coba Dipapar 2,3,7,8- <i>tetrachloro-dibenzo-p-dioksin</i> (TCDD).....	39
4.4.2.1 Persiapan Hewan Coba .....	39
4.4.2.2 Hewan Coba Dipapar dengan 2,3,7,8- <i>tetrachloro-dibenzo-p-dioksin</i> (TCDD).....	39
4.4.2.3 Pemberian Kasein Yoghurt Susu Kambing .....	40
4.4.3 Pengambilan Organ Lambung.....	40
4.4.4 Pengukuran Kadar Malondialdehida (MDA) Lambung .....	41
4.4.5 Pembuatan dan Pembacaan Preparat Histopatologi Lambung	41
4.5 Analisis Statistik .....	42
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	43
5.1 Pengaruh Pemberian Kasein Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) Lambung Tikus Putih ( <i>Rattus novergicus</i> ) yang Dipapar 2,3,7,8- <i>tetrachlorinedibenzo-p-dioksin</i> (TCDD)	43
5.2 Pengaruh Pemberian Kasein Yoghurt Susu Kambing Terhadap Gambaran Histopatologi Lambung Tikus Putih ( <i>Rattus novergicus</i> ) yang Dipapar 2,3,7,8- <i>tetrachlorinedibenzo-p-dioksin</i> (TCDD)	51
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	56
6.1 Kesimpulan .....	56
6.2 Saran .....	56
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	57
<b>LAMPIRAN</b> .....	63



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Komposisi Air Susu kambing .....	9
2.2 Kandungan Protein Susu Kambing dan Susu Sapi .....	10
2.3 Sifat Fisika dan Kimia TCDD .....	15
2.4 Data Biologi Tikus .....	20
4.1 Rancangan Penelitian .....	36
5.1 Kadar MDA (ng/ml) Lambung Tikus pada Berbagai Perlakuan .....	43



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Molekul Kasein.....	11
2.2 Struktur Kimia (2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD) dan Furan.	12
2.3 Alur Masuk TCDD ke Dalam Sel Tubuh.....	17
2.4 Histopatologi Lambung.....	19
2.5 Tikus Putih ( <i>Rattus novergicus</i> ).....	20
2.6 Anatomi Lambung .....	21
2.6 Histologi Lambung .....	22
3.1 Skema Kerangka Teori.....	29
3.2 Skema Kerangka Konsep .....	33
5.1 Diagram Perbandingan Kadar MDA (ng/ml) Lambung Tikus ( <i>Rattus novergicus</i> ) pada Berbagai Perlakuan .....	45
5.2 Histopatologi Mukosa Lambung Tikus Putih ( <i>Rattus novergicus</i> ).....	51

## LEMBAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Laik Etik.....	63
2. Surat Pernyataan Payung Penelitian.....	64
3. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian .....	65
4. Pembuatan Yoghurt Susu Kambing .....	66
5. Perhitungan Dosis Kasein Yoghurt Susu Kambing .....	68
6. Perhitungan Dosis 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioksin (TCDD).....	72
7. Prosedur Pemeriksaan Kadar Malondialdehida (MDA) Lambung.....	74
8. Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi dengan Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).....	75
9. Data Absorbansi dan Perhitungan Kadar Malondialdehida (MDA) Lambung	76
10. Data Hasil dan Uji Statistika Kadar Malondialdehida (MDA) Lambung	77

## DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

%	: Persen
μl	: Microliter
α	: Alfa
°	: Derajat
O <sub>2</sub>	: Oksigen
b/v	: Berat per volume
ANOVA	: <i>Analysis of variance</i>
BAL	: Bakteri Asam Laktat
BB	: Berat Badan
C	: Celcius
Ca	: Calsium
cm	: Centimeter
Fe	: Besi
FKH	: Fakultas Kedokteran Hewan
L	: Liter
g	: Gram
IARCH	: International Agency for Research on Cancer
IKB	: <i>Inhibitor Kappa Beta</i>
kkal	: Kilokalori
kDa	: KiloDalton
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
mm	: Milimeter
mmHg	: Milimeter Merkuri Hydrargyrum
mg	: Milligram
mL	: Mililiter
NaCl	: Natrium klorida
NFKB	: <i>Nuclear Factor Kappa Beta</i> )
ng	: Nanogram
M	: Nanometer
P	: Phosphor
PCA	: <i>Protocatechuic asam</i>
PCDD	: <i>Polychlorinated dibenzodioxins</i>
PUFAs	: <i>Polyunsaturated fatty acid</i>
RO	: <i>Reverse osmosis</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
rpm	: <i>Rotation per minutes</i>
TCDD	: <i>Tetrachlorinedibenzo-p-dioksin</i>
TEQ	: Toxicity Equivalet
POPs	: <i>persistent organic pollutant</i>
TCDD	: <i>2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin</i>

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Penelitian

Seiring semakin pesatnya perkembangan ekonomi, teknologi, dan pembangunan baik di wilayah perkotaan dan subperkotaan maka diikuti pula oleh peningkatan sektor industri dan transportasi yang diikuti juga oleh peningkatan kebutuhan energi. Peningkatan ini merupakan suatu hal yang dapat menurunkan kualitas udara di suatu daerah. Kualitas udara tersebut dipengaruhi oleh konsentrasi zat pencemar dalam udara (Soemarno, 1999). Pencemaran udara dapat didefinisikan yaitu masuknya zat pencemar kedalam udara, baik secara alamiah maupun akibat hasil kegiatan manusia (Soedomo, 2001). Sumber pencemaran alami, antara lain debu akibat letusan gunung api, debu meteorit, dan kebakaran hutan. Sumber pencemaran akibat aktifitas manusia, antara lain produksi industri, aktivitas transportasi, dan pembuangan/pembakaran sampah.

Jenis zat toksik yang banyak terkandung di udara tercemar salah satunya yaitu dioksin. Dioksin atau dalam rantai kimia 2,3,7,8-*tetrachlorinedibenzo-p-dioksin* (TCDD) merupakan pencemar udara yang belum banyak orang ketahui, yang termasuk dalam golongan senyawa yang persisten (*persistent organic pollutant*, POP's). Pencemaran senyawa ini dapat timbul dikarenakan berbagai kegiatan seperti hasil samping industri atau pembakaran mengandung klor (UNEP, 2003). Dioksin berdampak negatif terhadap lingkungan untuk waktu yang cukup lama.

2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-*p*-dioksin (TCDD) merupakan jenis dioksin yang paling toksik diantara jenis dioksin yang lain. Menurut Suminar (2003), sumber pencemaran emisi dioksin/furan terbesar di Indonesia berasal dari pembangkit listrik dan pemanasan, yaitu sebesar 66%, diikuti oleh industri pulp dan kertas (21%), pembakaran tidak terkendali (7,7%), industri besi dan non- besi (4,5%) dan sisanya merupakan hasil pembakaran dari industri mineral, transportasi, dan tempat pembuangan sampah. Dioksin terbentuk ketika terjadi pembakaran dari semua sampah yang mengandung klorin, pabrik dari PVC atau *polyvinyl chloride* atau plastik, produksi dari bahan kimia, seperti herbisida, pestisida, *chlorinated benzenes*, industri kertas, dan pulp yang menggunakan pemutih klorin. Selain karena aktivitas manusia, dioksin juga dapat terbentuk karena aktivitas alam yang berasal dari kebakaran hutan maupun aktivitas gunung berapi. Karena sifat fisik dan kimia, dioksin terutama dapat ditemukan di lapisan tanah, sedimen, dan biota (Supeno, 2007).

2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-*p*-dioksin (TCDD) sangat berbahaya bagi kelangsungan makhluk hidup, baik bagi kesehatan manusia, tumbuhan, dan hewan. Penyakit yang dapat ditimbulkan antara lain dapat memicu kanker, alergi, merusak susunan saraf, dan dapat mengganggu sistem endokrin yang menyebabkan kerusakan pada sistem reproduksi dan sistem kekebalan (Matsushita, 2003; NIEHS, 2001). 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-*p*-dioksin (TCDD) juga dapat menyebabkan kerusakan genetis dan penurunan daya tahan tubuh. Pada konsentrasi berkisar antara satu hingga beberapa miligram saja dapat menyebabkan kematian pada hewan (Rini, 2002). Meskipun hewan

tersebut hidup, cacat lahir telah diamati pada hewan (terutama hewan berkembang) yang terpapar lebih tinggi dari tingkat latar belakang TCDD, cacat kelahiran manusia akibat paparan TCDD saat ini tidak dapat dikonfirmasi (ASTDR, 1998). Kemungkinan efek kesehatan satwa liar yang disebabkan oleh gangguan endokrin dari TCDD dan bahan kimia sejenis, seperti PCB, DDT, dan beberapa pestisida termasuk, penurunan kesuburan dalam kerang, ikan, burung, dan mamalia; penurunan penetasan pada ikan, burung, dan reptil; penurunan kelangsungan hidup; dan perubahan fungsi kekebalan dan perilaku pada burung dan mamalia (EPA, 1997). Senyawa tersebut dapat memberikan dampak jangka panjang maupun jangka pendek terhadap kesehatan makhluk hidup juga lingkungan dan dalam rantai makanan terakumulasi pada jaringan lemak (lipofilik), sehingga sukar larut dalam air (Connel dan Miller, 1995). Sifat lipofilik inilah menyebabkan jika TCDD ini tercerna hingga masuk kedalam tubuh hewan maka TCDD akan tersimpan didalam lemak tubuh hewan tersebut. 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-*p*-dioksin (TCDD) yang terkandung dalam pakan yang tercemar akan terus menumpukkan zat toksik tersebut hingga daging hewan termakan oleh manusia yang dapat teracuni oleh TCDD (Aritonang, 1999). Pada penelitian Hutahean *et al.*, (2009), pemberian dosis 5 µg/kgbb TCDD, apabila diberikan pada induk mencit pada hari ke 9-10 kebuntingan, menyebabkan 60,3 % dari janin yang dihasilkan menderita cacat *cleft palate*; apabila dosis ditingkatkan menjadi 10 µg/kg bb, janin *cleft palate* yang dihasilkan mencapai 94,8 %. Berdasarkan penelitian tersebut dengan dosis TCDD yang kecil saja sudah dapat menyebabkan mutasi genetik.

Stress oksidatif merupakan peningkatan jumlah radikal bebas yang ada didalam tubuh sehingga melebihi batas tubuh untuk dinetralisir, dimana menurut Price dan Wilson (2006), radikal bebas merupakan senyawa reaktif yang dapat merusak sel tubuh. Apabila radikal bebas memproduksi secara berlebihan akan berakibat antioksidan dalam tubuh tidak mampu diatasi (Wresdiyati dan Astawan, 2005). Malondialdehida (MDA) merupakan salah satu indikator untuk mengukur stress oksidatif yang disebabkan karena terdapat akumulasi radikal bebas (Arkhaesi, 2008). Semakin tinggi kadar radikal bebas pada suatu organ maka semakin tinggi kadar MDA organ tersebut (Luczaj dan Elzbieta, 2003).

Tubuh jika tidak mampu menetralsir radikal bebas yang ada, maka radikal-radikal bebas tersebut dapat mengganggu sel jaringan ataupun organ (Price dan Wilson, 2006). Sel jaringan yang dapat terganggu adalah lambung. Pemasukan TCDD kedalam tubuh akan memicu produksi radikal bebas berupa *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebihan, akan menurunkan kemampuan antioksidan seluler dalam mempertahankan keseimbangan faktor defensif dan agresif, sehingga kerusakan mukosa lambung tidak dapat dihindari (Fernandes, *et al.*, 2005). Radikal bebas yang tinggi didalam tubuh menyebabkan keadaan stress oksidatif, peningkatan ROS sehingga memicu keaktifan dari *Nuclear Factor Kappa Beta* (NFKB) yang merupakan faktor transkripsi dan pengatur ekspresi banyak gen yang terlibat dalam respon imun dan inflamasi. *Nuclear Factor Kappa Beta* (NFKB) aktif dapat meningkatkan ekspresi gen *inducible macrophage-type nitric oxide synthase* (iNOS) yang berperan dalam proses peradangan. Proses peradangan melibatkan sel radang,



yaitu makrofag yang bekerja mengeluarkan sitokin pro inflamasi dan memicu proses inflamasi dalam jaringan mukosa lambung. Inflamasi yang berkepanjangan menyebabkan proses adaptasi sel dan perubahan histopatologi sel mukosa lambung (Irramah, 2017). Kehadiran radikal bebas yang berlebih ini berpotensi merusak membran sel melalui alur reaksi yang kompleks, yaitu dengan peroksidasi lipid (*Lipid Peroxidation*). Produk akhir dari reaksi ini adalah terputus rantai asam lemak menjadi MDA, etana ( $C_2H_6$ ), pentana ( $C_3H_{12}$ ), 9-hidroksi-nonenal, dan 4-hidroksi-2-nonenal (HNE). Diantara semua produk akhir diatas, MDA merupakan produk yang bersifat stabil dan bertahan lebih lama didalam darah sehingga dapat dijadikan indikator untuk menilai senyawa-senyawa yang bersifat antioksidan (Ayala, *et al.*, 2014).

Terapi yang dianjurkan untuk mengatasi peningkatan radikal bebas, yaitu dengan mengimbangi mengkonsumsi antioksidan yang tinggi. Salah satu alternatif yang dapat digunakan adalah dengan mengkonsumsi kasein yoghurt susu kambing. Komponen susu kambing yang digunakan yaitu kasein, yang merupakan komponen protein utama yang ada didalam susu dan juga mengandung sumber peptida sebagai antioksidan (Kitts & Weiler, 2003; Silva and Malcata, 2005; Contretas *et al.*, 2009; Contretas *et al.*, 2011). Fungsi antioksidan dimana zat tersebut akan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif (Robert, 2003). Antioksidan tersebut terkandung dalam peptida kasein susu, tetapi peptida dalam kasein susu tersebut memiliki sifat inaktif, sehingga memerlukan enzim proteolitik untuk dapat teraktivasi. Enzim ini

dapat diperoleh dari bakteri, khususnya bakteri asam laktat dengan cara difermentasikan menjadi bentuk yoghurt (Korhonen dan Pihlanto, 2006; Misel, 2005; Posecion *et al.*, 2005; de Medina *et al.*, 2010).

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan diatas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah kasein dalam yoghurt susu kambing memiliki efek preventif terhadap paparan TCDD yang diamati dari kadar MDA dan gambaran histopatologi lambung.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

- 1) Bagaimanakah pengaruh preventif kasein yoghurt susu kambing terhadap kadar MDA lambung tikus putih (*Rattus novergicus*) yang dipapar TCDD ?
- 2) Bagaimanakah pengaruh preventif kasein yoghurt susu kambing terhadap gambaran histopatologi lambung tikus putih (*Rattus novergicus*) yang dipapar TCDD ?

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Hewan model yang digunakan adalah tikus putih (*Ratus norvegicus*) strain *Wistar* jantan, berumur 8-12 minggu, dengan berat 150-250 gram, sebanyak 24 ekor yang didapat dari Penyedia Hewan Laboratorium D'wistar, Jalan Deme No 66 Gatot Subroto, Bandung dan telah mendapat

keterangan laik etik dengan nomor: 710-KEP-UB dari komisi Etik Penelitian (*Animal Care and Use Commite*) Universitas Brawijaya (**Lampiran 1**).

- 2) Paparan TCDD sebagai induktor toksik lambung digunakan 2,3,7,8 – *tetrachloro-dibenzo-p-TCDD* (2,3,7,8-TCDD Sigma 48599) secara peroral dengan sonde lambung selama 21 hari. Penelitian ini menggunakan dosis tunggal TCDD, yaitu 100 ng/kgBB/hari. Dosis TCDD ditentukan berdasarkan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Fujimaki *et al.*, (2002) dan Yin *et al.*, (2012). Minyak jagung sebanyak 100 ml digunakan untuk melarutkan TCDD.
- 3) Terapi yang diberikan berupa kasein yoghurt susu kambing Etawa segar dari Surabaya Valenta Goat Milk dan *starter* yoghurt (*Yógourmet Yoghurt Starter, LYO-SAN. INC 500 Aéoparc, C. P. 598, Lachute, QC. Canada, J8H 4G4*) yang mengandung bakteri *L. Bulgaricus*, *S. Thermophilus* dan *L. Acidophilus* dengan dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB dan 900 mg/kg BB yang diberikan selama 21 hari per oral dengan sonde lambung dan diarutkan dengan air *Reverse Osmosis* (RO) sebanyak 1 ml (Contrers *et al.*, 2009).
- 4) Parameter yang diamati adalah kadar *malondialdehid* (MDA) yang diukur dengan menggunakan metode *Thiobarbituric Acid* (TBA) dengan pengukuran menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 530 nm (Aulanni'am *et al.*, 2013), dan gambaran histopatologi lambung menggunakan metode pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) berupa kerusakan mukosa lambung.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

- 1) Untuk mengetahui pengaruh preventif kasein yoghurt susu kambing terhadap kadar MDA lambung tikus putih (*Ratus norvegicus*) yang dipapar TCDD.
- 2) Untuk mengetahui pengaruh preventif kasein yoghurt susu kambing terhadap gambaran histopatologi lambung tikus putih (*Ratus norvegicus*) yang dipapar TCDD.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan oleh penulis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai kajian ilmiah pemanfaatan kasein yoghurt susu kambing sebagai antioksidan untuk mengurangi kadar radikal bebas akibat paparan TCDD.
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai literatur pemanfaatan kasein yoghurt susu kambing sebagai antioksidan dalam dunia kedokteran hewan.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Kasein Yoghurt Susu Kambing

Susu kambing merupakan sumber protein hewani yang memiliki gizi yang sangat baik (Sarwono, 2007). Menurut Padaga dkk. (2009), susu kambing memiliki protein spesifik pada berat molekul 36-55 kDa yang berbeda dengan susu lainnya. Protein spesifik tersebut mempunyai fungsi sebagai antioksidan, immunomodulator dalam perbaikan jaringan yang rusak, dan antiinflamasi.

**Tabel 2.1** Komposisi air susu kambing

Komponen	Presentasi (%)
Bahan kering	13,2
Lemak	4,5
Protein	2,9
Kasein	2,5
Laktosa	4,1

Sumber. Hidayat *et al.*, (2006)

Susu kambing ini mempunyai kemampuan sebagai pembawa bakteri probiotik dikarenakan susu kambing mempunyai komposisi bahan yang relatif baik yang dapat mendukung aktifitas metabolisme sel-sel probiotik di dalamnya dan juga mencukupi ketersediaan energi untuk menjalankan fungsi sel. Dalam susu kambing segar ditemukan adanya bakteri asam laktat yang dapat menghasilkan probiotik dengan komposisi spesies yang bermacam-macam (Guessas dan Kihal, 2004). Susu kambing memiliki globula lemak yang lebih kecil sehingga lebih mudah dicerna dibandingkan dengan susu sapi dan memiliki sifat alergi yang lebih rendah dibandingkan susu sapi (Aliaga *et al.*, 2003). Menurut Ceballos *et al.* (2009), penyerapan asam amino

susu kambing lebih efisien daripada susu sapi. Hal ini menunjukkan susu kambing lebih baik daripada susu sapi.

**Tabel 2.2** Kandungan protein susu kambing dan susu sapi

No.	Keterangan	Susu Kambing (g/100g protein)	Susu Sapi (g/100g protein)
1.	<i>Casein</i> (CN)	82,70	82,65
2.	$\alpha_{s1}$ -CN	18,92	30,80
3.	$\alpha_{s2}$ -CN	8,52	7,50
4.	$\beta + \kappa$ -CN	55,26	44,35
5.	<i>Whey Protein</i>	17,30	17,35

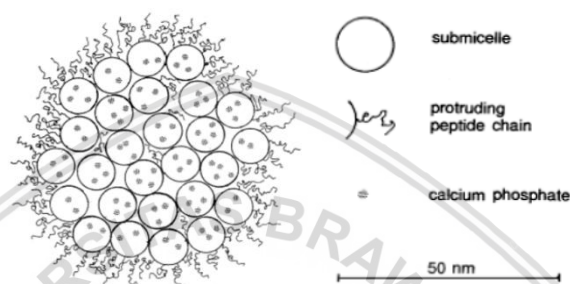
(Aliaga *et al.*, 2003)

Kasein (CN) merupakan protein yang ada dalam susu yaitu berkisar 80% dari total protein dan merupakan sumber terpenting dari peptida. Kasein terdiri dari lebih dari satu protein yang diantaranya  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta + \kappa$ -CN, dan  $\kappa$ -kasein (Kitts & Weiler, 2003; Silvia & Malcata, 2005). Ukuran kasein pada susu kambing lebih besar yaitu 100-200 nm dibandingkan dengan susu sapi yang berukuran 60-80 nm. Perbedaan lainnya yaitu pada kandungan protein  $\alpha_{s1}$ -CN.  $\alpha_{s1}$ -CN merupakan salah satu protein penyebab alergi. Pada susu kambing kandungan  $\alpha_{s1}$ -CN antara 0-7 g/L yang kandungannya lebih rendah dibandingkan dengan susu sapi sehingga dengan mengonsumsi susu kambing dapat menghindari alergi yang disebabkan oleh susu sapi. Variasi ini berhubungan dengan polimorfisme genetik  $\alpha_{s1}$ -CN (Martin *et al.*, 2003).

Kasein merupakan sumber yang paling penting dari peptida yang punya banyak manfaat bagi kesehatan tubuh. Pada kasein susu kambing dapat ditemukan adanya peptida yang mempunyai aktivitas antihipertensi yaitu sebagai *angiotensin converting enzyme inhibitor (ACE-inhibitor)*. Menurut Kitts dan Weiler (2003), selain mempunyai manfaat sebagai antihipertensi, kasein mampu bekerja untuk meningkatkan aktivitas antioksidan.



Berdasarkan penelitian terdahulu menunjukkan bahwa peptida antioksidan dilepaskan dari kasein yang dihidrolisis dengan enzim digesti dan fermentasi susu. Peptida yang diketahui berasal dari  $\alpha_{s1}$ -CN dan menunjukkan aktivitas *free radical-scavenging* (menangkap radikal bebas) dan dapat menghambat peroksidasi lipid secara enzimatis maupun non-enzimatis (Korhonen & Pihlanto, 2006).



**Gambar 2.1** Struktur Molekul Kasein (Walstra, 1999)

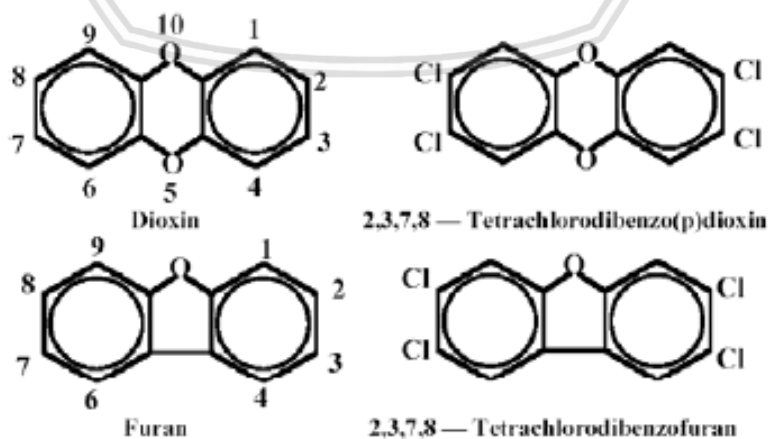
Pengolahan susu yang difermentasikan salah satunya menjadi yoghurt. Yoghurt dapat dibuat dari susu sapi dan juga susu kambing (Stelios dan Emmanuel, 2004). Yoghurt dibuat dengan menggunakan proses fermentasi susu yang ditambahkan dengan kultur *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* yang tiap organisme memiliki tingkat keasaman dan spesifikasi pada aroma dan rasa produk yoghurt yang juga kedua spesies bakteri ini bersifat *mutual synergism* (Almena *et al.*, 2005; Masato *et al.*, 2005).

Menurut Padaga dkk (2009), yoghurt susu kambing berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Selain itu, pemberian yoghurt susu kambing ke dalam tubuh dapat mempengaruhi peningkatan antioksidan dalam tubuh serta peningkatan bakteri asam laktat dalam duodenum sehingga keadaan antioksidan di dalam tubuh tikus stabil dan cenderung akan meningkat.



## 2.2. Dioksin / 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD)

Dioksin merupakan nama umum untuk sekelompok senyawa pencemar penting yang masuk ke dalam golongan bahan pencemar organik yang sulit teruraikan (*Persistent Organic Pollutants* / POPs). Terdapat 75 senyawa *Polychlorinated Dibenzodioksins* (PCDD) yang termasuk ke dalam kelompok dioksin. Dioksin adalah kelompok senyawa yang bersifat racun (toksik) dan diketahui secara nyata merupakan faktor pemicu kanker (Isa, 2011). Senyawa dioksin tersusun atas dua cincin benzena, dua oksigen, dan empat atom klor di setiap molekulnya. Sebagian besar senyawa organoklorin, seperti dioksin menimbulkan efek racun. Klor adalah unsur halogen yang sangat reaktif, sehingga mudah bereaksi dengan senyawa organik atau senyawa lain. Atom klor yang terdapat pada senyawa PCDD menghasilkan sampai 75 isomer dengan toksisitas yang sangat bervariasi. Menurut Rier (2002), senyawa seperti 2, 3, 7, 8-tetrakloro *dibenzo-p*-dioksin (TCDD) mempunyai posisi lateral dan mempunyai 4 sampai 6 atom klor yang menunjukkan bahwa senyawa ini sangat reaktif dan mempunyai potensi toksisitas tinggi.



**Gambar 2.2** Struktur Kimia 2, 3, 7, 8-tetrakloro *dibenzo-p*-dioksin (TCDD) dan Furan (Fiedler, 2001)

Berdasarkan dari struktur kimia, dioksin dan furan mempunyai struktur dasar yang sama, yaitu mempunyai 2 cincin benzena dengan substansi klorin, sehingga kedua senyawa ini memiliki kesamaan sifat (Fiedler, 2001). Meskipun sama, toksisitas dari furan lebih rendah daripada dioksin (Akhadi, 1999). Kedua senyawa tersebut berbentuk padatan kristal yang tidak berwarna pada suhu ruang dan mempunyai kestabilan termal yang cukup tinggi. Zat tersebut dapat larut dalam pelarut polar maupun nonpolar, tetapi tingkat kelarutannya lebih cenderung tinggi pada jaringan yang bersifat lipofilik atau lemak. Salah satu sifat dioksin/furan yang berdampak negatif terhadap lingkungan adalah daya urainya sangat lambat, baik di tanah, udara, dan air (Gorman & Tynan, 2003).

Senyawa kimia dioksin ini dapat dihasilkan dari proses alam maupun akibat dari aktivitas manusia. Dioksin yang terbentuk akibat aktivitas manusia yaitu terbentuk dari proses industri kimia yang melibatkan klorin. Seperti halnya industri pulp dan kertas yang menyumbang pembuangan dioksin di udara (Martunus, 2007). Pencemaran dioksin tercatat menimbulkan penurunan kualitas udara. Sebagai contoh, adanya peleburan besi di Belanda yang menyebabkan kualitas udara terkontaminasi dioksin sebesar 22.700 pg/gr debu (Rappe, 1996). Pembakaran sampah dalam suhu rendah juga dapat menimbulkan gas dioksin daripada insenerator yang terkontrol. Sumber pencemaran emisi dioksin di Indonesia sendiri yang terbesar adalah hasil emisi pembangkit listrik, industri pulp dan kertas, pembakaran yang tak terkontrol, tempat pembuangan akhir sampah, dan industri besi (Suminar, 2003). Dioksin yang dihasilkan oleh aktivitas alam antara lain akibat

kebakaran hutan dan letusan gunung berapi. Akan tetapi, dioksin sangat jarang akibat aktivitas alam dan sebagian besar akibat aktivitas manusia. Dioksin yang terakumulasi di udara dapat kembali ke tanah yang dapat jatuh ke daerah yang jauh dari sumber pencemaran. Yang berbahaya ketika dioksin jatuh di tempat pemeliharaan ternak seperti halnya sapi. Dioksin dapat tersimpan dalam lemak sapi yang berada dalam lemak susu dan lemak daging. Zat ini jelas tidak akan termetabolisme sehingga dioksin akan tersimpan di lemak. Begitu juga ikan yang tertelan air atau memakan makanan yang tercemar oleh dioksin yang jatuh dari udara akan tersimpan dalam lemak ikan. Hal itu terus terjadi dalam suatu rantai makanan hingga dioksin terdeposit dalam tubuh manusia (Rier, 2002).

Dioksin resisten terhadap degradasi dikarenakan memiliki sifat yang bioakumulasi, biomagnifikasi, dan lipofilik (Rier, 2002). Menurut Travis (1991), dioksin sifatnya sangat stabil, baik untuk lingkungan, keanekaragaman hayati, terkonsentrasi di lingkungan, dan bioakumulasi dalam rantai makanan. Sifatnya juga larut lemak dan tidak larut dalam air. Dioksin berkonsentrasi di dalam sedimen dan dimasukkan ke dalam jaringan lemak ikan, burung, reptil, dan mamalia. Sebagian besar kehadirannya di tanaman disebabkan karena pengangkutan partikel pada atmosfer, mengakibatkan dioksin menetap di jaringan tanaman berdaun. Sifat kimia dan fisika dari dioksin tercantum pada **Tabel 2.3**

**Tabel 2.3** Sifat Fisika dan Kimia TCDD

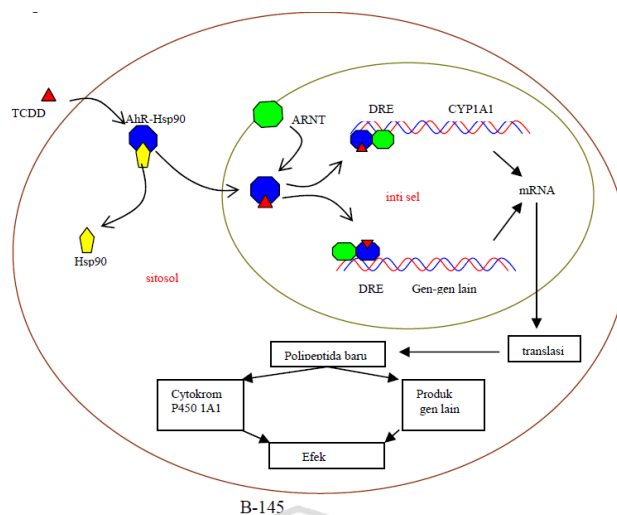
Sifat Fisik dan Kimia	Parameter
Titik Didih ( $^{\circ}\text{C}$ )	284-510
Titik Leleh	89-322
Kelarutan ( $\text{gL}^{-1}$ )	
a. o-diklorobenzena	1,4
b. kloroform	0,37
c. n-oktanol	0,048
d. methanol	0,01
e. air	$2 \times 10^{-7}$
Waktu Paruh	
a. Udara	2 hari – 3 minggu
b. Air	2 hari – 8 bulan
c. Tanah	2 bulan – 6 tahun
d. Sedimen	8 bulan – 6 tahun
Suhu dekomposisi ( $^{\circ}\text{C}$ )	>700

(Connel dan Miller, 1995)

Menurut Rier (2002) yang dimaksud dengan dioksin adalah 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p* dioxin (TCDD). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD) merupakan prototipe dari *polyhalogenated aromatic hydrocarbons* (PHAHs), yang termasuk berkerabat dekat dengan zat kimia yang mempunyai mekanisme aksi yang sama dan spektrum efek yang sama disebut juga zat seperti dioksin. golongan PHAHs antara lain : *polychlorinated dibenzofurans* (PCDFs), *polychlorinated dibenzo-p-dioxins* (PCCDs), dan *polychlorinated biphenyls* (PCBs) (Rier, 2002; Bimbaum, 2002; Pauwels *et. al*, 2001). Toksisitas dari setiap zat dan zat seperti dioksin ini dapat dihitung dengan menggunakan metode TEF dimana setiap zat seperti dioksin mempunyai faktor potensi tingkat keracunan dibandingkan dengan TCDD (Rier, 2002; Pauwels *et. al*, 2001). *Total Toxic Equivalency* (TEQ) merupakan hasil penjumlahan toksisitas TCDD dan zat seperti dioksin yang telah dikalikan oleh TEF masing-masing menunjukkan total tingkat keracunan dioksin. Kebanyakan negara industri mempunyai kadar dioksin yang sama dalam

tubuh untuk populasi umum. Kadar dioksin dalam badan dipengaruhi dari masukan makanan sehari-hari. Satuan penghitungannya adalah *part per trillion* (ppt), dimana rata-rata negara industri dengan paparan PHAHs mencapai kadar TCDD serum 1-5 ppt dengan endapan diseluruh tubuh mencapai 25 ppt TCDD TEQ (TCDD *equivalency*) (Rier, 2002; Bimbaum, 2002).

Menurut Aritonang (1999), mekanisme masuk dioksin kedalam tubuh melalui beberapa cara, seperti tertelan bersama makanan atau minuman (*ingestion*) dan juga melalui penghirupan (*inhalation*) udara yang tercemar dioksin, atau melalui kontak kulit (*dermal contact*). Sebelum berada di tanah, kemungkinan penyebaran dioksin melalui udara, seperti terhirup manusia atau hewan besar terlebih dahulu. Dioksin yang masuk ke tanah berpotensi terserap akar tanaman dan melalui rantai makanan sampai ke makhluk hidup lain. Dioksin dapat masuk ke dalam tubuh melalui pernafasa, kulit, atau mengkonsumsi makanan secara langsung dan waktu paruh dioksin dalam tubuh manusia sekitar 7 tahun (Soemarwoto, 2004). Dioksin mempengaruhi sel sama seperti kerja estrogen, yaitu masuk ke dalam sel dan berikatan dengan protein yang ada pada sel yang disebut reseptor Ah.



**Gambar 2.3** Alur masuknya TCDD ke dalam sel tubuh (Landers and Bunce, 1991)

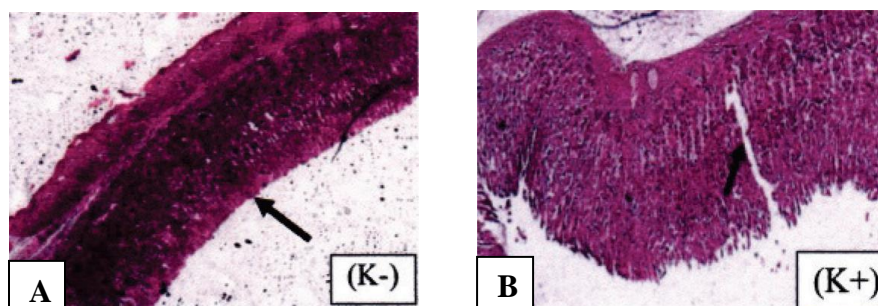
Efek toksik TCDD diperantarai oleh reseptor khusus (*Aryl hydrocarbon receptor* / *AhR*) yang terletak di sitosol. Efek tersebut muncul toksiknya ketika TCDD mula-mula menembus selaput sel dan diikat oleh AhR, kemudian memasuki inti dan membentuk senyawa kompleks baru dengan protein translokator yaitu *AhR Nuclear Translocator* (ARNT). Senyawa kompleks TCDD-AhR-ARNT akan mengikat ujung 5' sekuen promotor DNA tertentu (*Dioxin Responsive Element*) dan mempengaruhi ekspresi gen-gen di hilir promotor tersebut (Landers and Bunce, 1991; Denison and Heath-Pagliuso, 1998). Cara itulah TCDD mempengaruhi ekspresi ratusan gen (Boverhof *et al.*, 2005). Pada awalnya AhR dikenal juga sebagai reseptor dioksin karena dalam jangka waktu lama ligan endogenous dan alamiah dari AhR tidak pernah ditemukan (Marika *et al.*, 1994). Belakangan diketahui terdapat sejumlah senyawa *Polycyclic Aryl Hydrocarbon* (PAH) tak berhalogen dapat terikat ke AhR dan menghasilkan sejumlah efek biologis yang mirip seperti yang dihasilkan oleh dioksin dan *halogenated aryl*



*hydrocarbon* (HAH) lainnya. Berbeda dengan HAH yang toksik, PAH tidak menimbulkan efek toksik. AhR yang mengikat ligan-ligan alamiah (kompleks PAHAhR) akan melalui jalur yang sama seperti yang dilalui kompleks dioksin-AhR. Akan tetapi, AhR yang mengikat ligan alamiah dengan segera terdegradasi setelah reaksi berlangsung (Davarinos dan Pollenz, 1999), sedangkan AhR yang terikat dioksin mengalami stabilisasi, menyebabkan ekspresi gen yang dipengaruhi menjadi berkelanjutan (Bohonowych dan Denison, 2004). Ekspresi gen yang terus menerus membutuhkan sintesis rRNA dan ribosom yang lebih banyak dan berkelanjutan dan dengan demikian aktivitas sintesis ribosom di kromosom-kromosom spesifik meningkat. Hal ini mengisyaratkan TCDD mendorong sintesis protein berkelanjutan di sel tubuh.

Seperti yang kita ketahui bahwa TCDD adalah agen oksidatif yang signifikan dan menyebabkan kerusakan parah di banyak organ termasuk lambung akibat peningkatan stress oksidatif. Kerusakan sel yang ditimbulkan baik berupa adanya perubahan di sel mukosa, TCDD juga dapat beresiko menyebabkan kanker. Kanker dapat disebabkan oleh adanya serangan radikal bebas pada DNA dan RNA dalam inti sel sehingga terjadi kanker di organ lambung. Antioksidan dapat berperan mengurangi lesi karsinogen atau menghambat berkembangnya sel kanker (Bagchi, 1998). Pada percobaan Irramah (2017), meneliti bahwa efek dari keluarnya radikal bebas yang disebabkan agen toksik dapat menyebabkan adanya deskuamasi, erosi, bahkan ulserasi dari epitel lambung. Lesi dapat dilihat dari lapisan mukosa baik kardia, pilorus, korpus, dan fundus.





**Gambar 2.4** Histopatologi Lambung

Keterangan :

- (a) Menunjukkan histologi normal pada lambung.
  - (b) Efek radikal bebas menyebabkan adanya ulser pada jaringan epitel lambung. Pewarnaan dengan menggunakan Hematoxylin dan eosin.
- (Irramah, 2017)

### 2.3. Tikus

Hewan coba merupakan hewan yang digunakan sebagai hewan model untuk mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian dan pengamatan penelitian. **Gambar 2.4**, menunjukkan ciri-ciri tikus putih, yaitu rambut berwarna putih, mata merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm dan pada usia dewasa berat badannya kisaran 100-150 gram (Akbar, 2010). Adapun sistem klasifikasi tikus *Rattus norvegicus* menurut Myers and Armitage (2004), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>



**Gambar 2.5.** Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Akbar, 2010).

Data biologi tikus disajikan pada **Tabel 2.4.** berikut :

**Tabel 2.4.** Data biologi tikus

No	Kondisi Biologi	Jumlah
1	Berat Badan	
	Jantan	300-400 gr
	Betina	250-300 gr
2	Lama hidup	2,5-3 tahun
3	Temperatur tubuh	37,5°C
4	Kebutuhan air	8-11 ml/100 gr BB
	Kebutuhan makanan	5 gr/100 gr BB
5	Umur dewasa	50-60 hari
6	Volume darah	57-70 hari
7	Tekanan darah	
	Sistolik	84-174 mmHg
	Diastolik	58-145 mmHg
8	Frekuensi jantung	330-480 / menit
9	Frekuensi respirasi	66-114 / menit
10	Tidal volume	0,6 – 1,25 mm

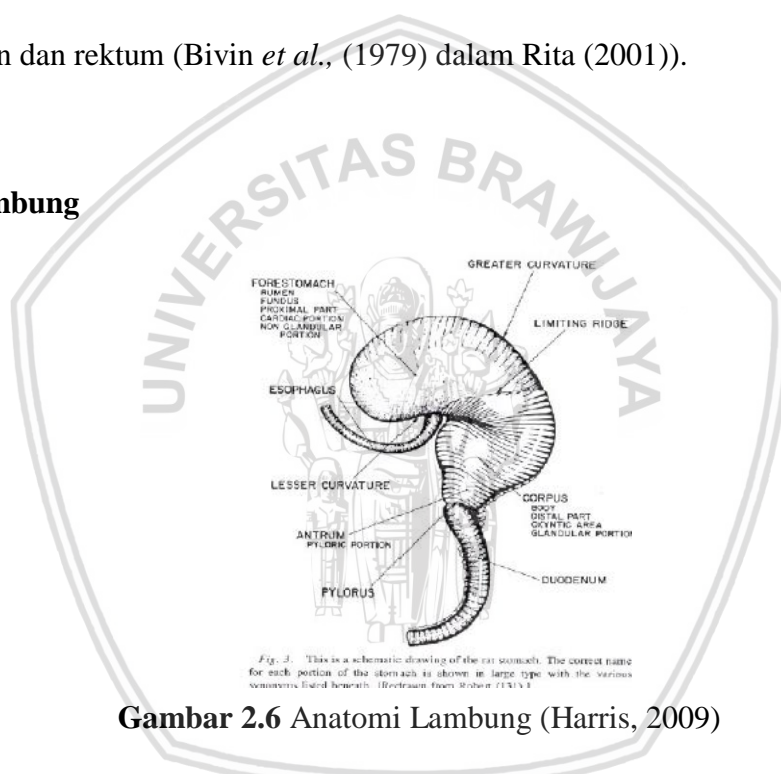
(Kusumawati, 2004).

Tikus putih yang digunakan untuk percobaan laboratorium yang dikenal ada tiga macam galur yaitu *Sprague Dawley*, *Long Evans* dan *Wistar*. Tikus *Rattus norvegicus* digunakan dalam setiap penelitian karena memiliki keunggulan berupa asam amino, sistem metabolisme dan organnya hampir sama dengan manusia sehingga memudahkan dalam penelitian, perkembangannya cepat dan mudah dipelihara dalam jumlah yang banyak (Akbar, 2010).

Secara umum sistem pencernaan pada tikus hampir sama dengan hewan mamalia lainnya. Alat pencernaan dimulai dari mulut, esofagus, lambung,

usus halus dan berakhir pada usus besar. Usus halus terdiri atas duodenum, jejunum dan ileum. Panjang usus halus ini kira-kira lima kali panjang usus besar. Fungsi penyerapan pada masing-masing bagian usus halus tergantung kepada jenis zat makanan yang akan diserap. Glukosa maksimum diserap di jejunum dan di bagian atas ileum, galaktosa di pertengahan dari ketiga usus halus, protein utuh dan albumin diserap di segmen paling ujung dari usus halus, sedangkan lemak diserap di jejunum. Usus besar terdiri dari sekum, kolon dan rektum (Bivin *et al.*, (1979) dalam Rita (2001)).

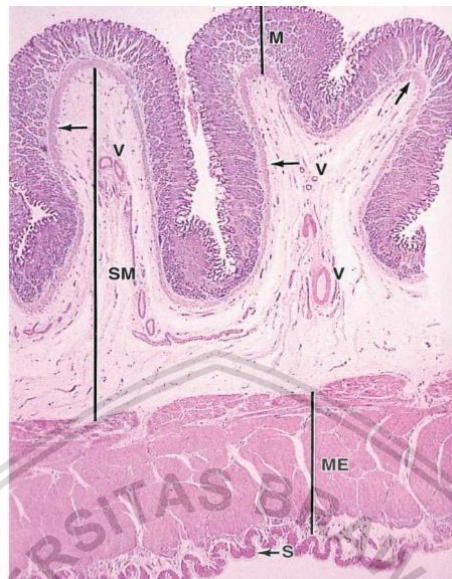
## 2.4. Lambung



**Gambar 2.6** Anatomi Lambung (Harris, 2009)

Lambung merupakan organ yang pertama dalam saluran pencernaan pada cavum abdomen yang dimana banyak terjadi aktifitas enzim di dalamnya. Lambung memiliki bentuk seperti buah pir yang mempunyai 2 bagian, yaitu bagian superior yang dibatasi oleh *sphincter* esophagus dan bagian inferior yang dibatasi oleh *sphincter* pylorus. Lambung terdiri atas antrum *cardia*, *fundus*, *corpus*, dan *pylorus*. Dinding lambung terdiri atas 4 tunika, yaitu tunika serosa yang terletak pada bagian luar, tunika muskularis propria yang

terdapat selubung serabut otot polos, tunika submukosa, dan tunika mukosa yang terletak pada bagian dalam lambung (Saunders, 1987).



**Gambar 2.7** Histologi Lambung (Mescher, 2009)

Lambung tikus hanya terdapat satu lambung (*monogastric*) yang terletak pada sisi kiri cavum abdomen yang berbatasan langsung dengan hati. Lambung dan organ pencernaan lainnya terikat ke rongga tubuh bagian dorsal oleh mesenterium yang kaya akan pembuluh darah. Mesenterium yang mengikat lambung pada bagian kurvatura mayor disebut omentum. Pada tikus juga terdapat 2 bagian penting untuk mencegah terjadinya muntah saat mencerna makanan, yaitu bagian sisi glandular dan sisi depan non-glandular yang berdinding tipis. Kedua bagian tersebut dibatasi oleh jembatan (*ridge*) yang melapisi pintu masuknya esofagus. Sisi depan non-glandular memiliki lipatan mukosa yang menyerupai mukosa lumen dan dilapisi oleh sel epitel skuamosa bertingkat dan berperan sebagai *reservoir*. Sisi glandular lambung (korpus) memiliki karakteristik adanya sumur lambung yang dilapisi oleh epitel kolumnar selapis. Kelenjar lambung terdiri dari sel parietal dan *chief*

*cell* / sel zimogen. Bagian pilorus lambung dilapisi oleh epitel kolumnar selapis yang juga melapisi perpanjangan sumur lambung. Dibawah lapisan tersebut terdapat kelenjar pilorus (Harris, 2009).

Lambung tikus dilapisi oleh mukosa dan selaput lendir yang dibentuk oleh sel epitel permukaan dimana akan menginvasi lamina propria yang berada dibawah untuk membentuk sumur-sumur atau biasa disebut *gastric pit*. Menurut Wibowo (2005), diantara sel-sel yang membentuk *gastric pit* terdapat sel yang menghasilkan asam lambung (HCl), pepsin, dan mukus. Produksi HCl dirangsang oleh pikiran, syaraf/emosi, dan makanan yang terdapat dalam mulut atau lambung. Lamina propria itu sendiri terdiri atas jaringan ikat, sel otot polos, dan sel limfoid. Tunika mukosa dan submukosa yang berada dibawah dipisahkan oleh otot polos yang disebut tunika muskularis mukosa (Harris, 2009). Dinding lambung diperkuat oleh otot yang memanjang, melintang, dan serong. Kedua jenis otot pertama terdapat dalam semua organ pencernaan yang lain, akan tetapi otot serong hanya terdapat pada lambung. Pada bagian akhir yaitu *pylorus*, otot melintang terdapat lebih tebal dan berfungsi sebagai *sphincter* yang berfungsi untuk menahan makan tidak langsung turun ke dalam duodenum (Wibowo, 2005).

## 2.5. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki sebuah elektron yang tidak berpasangan di orbit luarnya (*unpaired electron*). Dikarenakan mempunyai struktur molekul inilah yang membuat radikal bebas cenderung mengekstraksi satu elektron dari molekul lain di dekatnya untuk melengkapi



strukturnya yang selanjutnya mencetuskan reaksi berantai yang dapat mengakibatkan cedera sel (Suryohudoyo, 2000; Hendromartono, 2000). Zat ini juga memiliki bentuk radikal yang sangat reaktif dan memiliki waktu paruh yang pendek. Jika radikal bebas ini tidak diinaktivasi, maka reaktivitasnya dapat merusak seluruh tipe makromolekul sel yang diantaranya karbohidrat, protein, lemak, dan asam nukleat (Dawn *et al.*, 2000). Radikal bebas dapat bersifat anionik, kationik, atau netral (Punchard, 1996). Radikal bebas juga memiliki fungsi yaitu membunuh bakteri intraseluler. Namun, jika terdapat kandungan radikal bebas di dalam tubuh secara berlebih maka akan terjadi perampasan elektron atom komponen struktural maupun fungsional sel kemudian terjadi reaksi berantai (Niwa, 1997).

Sumber terbentuknya radikal bebas dapat berasal dari sumber internal dan eksternal. Radikal bebas yang dibentuk dari dalam dapat diakibatkan karena adanya absorpsi tenaga radiasi (sinar UV, sinar X) atau dalam reaksi reduksi oksidasi yang selama proses fisiologi normal atau juga dapat berasal dari metabolisme enzimatik bahan kimia eksogen. Tenaga radiasi dapat melisiskan air dan melepaskan radikal seperti ion hidroksil dan  $H^+$ . Radikal bebas yang lain adalah superoksida yang berasal dari reduksi molekul  $O_2$ . Oksigen secara normal direduksi menjadi air, tetapi pada dalam beberapa reaksi terutama yang menyangkut xantin oksidasi,  $O_2^-$  dapat terbentuk (Dawn *et al.*, 2000).



## 2.6. Malondialdehida

Malondialdehida merupakan metabolit hasil peroksidasi lipid yang dapat menjadi biomarker terhadap stress oksidatif yang ditimbulkan oleh paparan radikal bebas (Asni dkk, 2009). Radikal bebas bersifat reaktif dan cenderung tidak stabil sehingga sulit untuk mengukur kadarnya secara langsung tetapi dengan terbentuk produk peroksidasi lipid, seperti MDA secara tidak langsung dapat digunakan sebagai marker atau penanda keberadaan radikal bebas. Malondialdehida merupakan produk dekomposisi dari *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) peroksidasi. Peroksidasi lipid itu sendiri merupakan penyatuan molekul oksigen ke dalam PUFA pada membran biologis. Oksidasi PUFA oleh radikal bebas terjadi pada atom H yang sifatnya tidak stabil, terutama yang sudah terikat oleh atom C dekat dengan ikatan rangkap, sehingga terbentuklah radikal bebas yang baru dan sangat peka terhadap oksigen (radikal bebas peroksi) (Hasanah, 2008).

Malondialdehida termasuk ke dalam senyawa dialdehida yang merupakan produk akhir peroksidasi lipid dalam tubuh. Malondialdehida menunjukkan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh sebagai akibat dari adanya radikal bebas dalam tubuh. Jika sel tubuh terpapar oleh radikal bebas secara terus menerus akan menyebabkan terjadinya stress oksidatif. Adanya peningkatan stress oksidatif sebanding dengan peningkatan MDA. Menurut Rahardjani (2010), dengan kadar MDA yang tinggi menunjukkan adanya kerusakan jaringan yang lebih parah.

Mekanisme kerusakan sel akibat serangan radikal bebas yang paling awal diketahui dan terbanyak diteliti adalah peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid

paling banyak terjadi di membran sel, terutama asam lemak tidak jenuh yang merupakan komponen penting penyusun membran sel. Pengukuran tingkat peroksidasi lipid diukur dengan mengukur produk akhir, yaitu MDA (Lima *et. al.*, 2004). Malondialdehida (MDA) merupakan produk peroksidasi lipid yang relatif konstan terhadap proporsi peroksidasi lipid, oleh karena itu merupakan indikator yang tepat untuk mengetahui kecepatan (*rate*) proses peroksidasi lipid *in vivo*. Malondialdehida (MDA) memiliki tiga rantai karbon dengan rumus molekul  $C_3H_4O_2$  (Pryor *et. al.*, 1976).

Kerusakan jaringan lipid akibat *reactive oxygen species* (ROS) dapat diperiksa dengan mengukur senyawa MDA yang merupakan produk peroksidasi lipid (Reilly *et al.*, 1991). Produksi dari ROS ini sendiri secara tidak langsung dinilai dengan kadar peroksidasi lipid. Pengukuran kadar MDA serum dapat dilakukan dengan 2 metode, antara lain tes *thiobarbituric acid-reactive substance* (TBA) dan *high performance liquid chromatography* (HPLC). Dasar pemeriksaan dari tes TBA adalah reaksi spektrofotometri sederhana yang dimana satu molekul MDA akan terpecah menjadi molekul 2-asam thiobarbiturat. Reaksi ini akan berjalan pada pH 2-3. TBA akan memberikan warna pink-chromogen yang dapat diperiksa secara spektrofotometrik. Tes TBA ini tidak hanya mengukur kadar MDA yang terbentuk akibat proses peroksidasi lipid saja, tapi juga mengukur produk aldehid lainnya yaitu produk non-volatil yang terjadi akibat panas yang ditimbulkan pada saat pengukuran kadar MDA serum yang sebenarnya.

Metode HPLC merupakan metode pengukuran kadar MDA yang paling spesifik dan sensitif. Menurut Konig and Berg (2002), MDA bukan produk

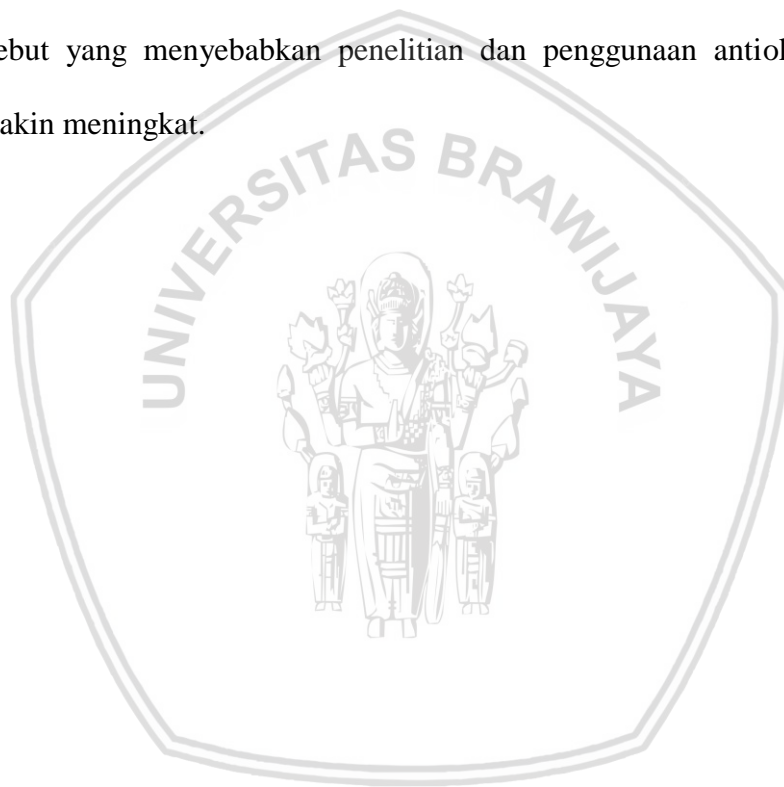
yang spesifik hasil dari proses proksidasi lipid sehingga dapat menimbulkan reaksi positif palsu yang berakibat nilai duga positif yang rendah, dan dilaporkan dapat meningkatkan spesifitas pada pemeriksaan kadar MDA serum. Kadar MDA dapat diperiksa baik dengan plasma, jaringan, maupun urin (Reilly *et al.*, 1991).

## 2.7. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Antioksidan merupakan substansi yang diperlukan oleh tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah adanya kerusakan jaringan akibat aktivitas radikal bebas terhadap sel normal pada tubuh yang dapat menyebabkan penyakit degeneratif. Menurut Sadikin (2001), serangan radikal bebas terhadap molekul sekelilingnya menyebabkan terjadinya reaksi berantai, yang kemudian menghasilkan senyawa radikal baru. Fungsi antioksidan dimana zat tersebut akan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif (Robert, 2003). Dampak dari reaktivitas senyawa radikal bebas antara lain mulai dari kerusakan sel atau jaringan, penyakit autoimun, hingga kanker.

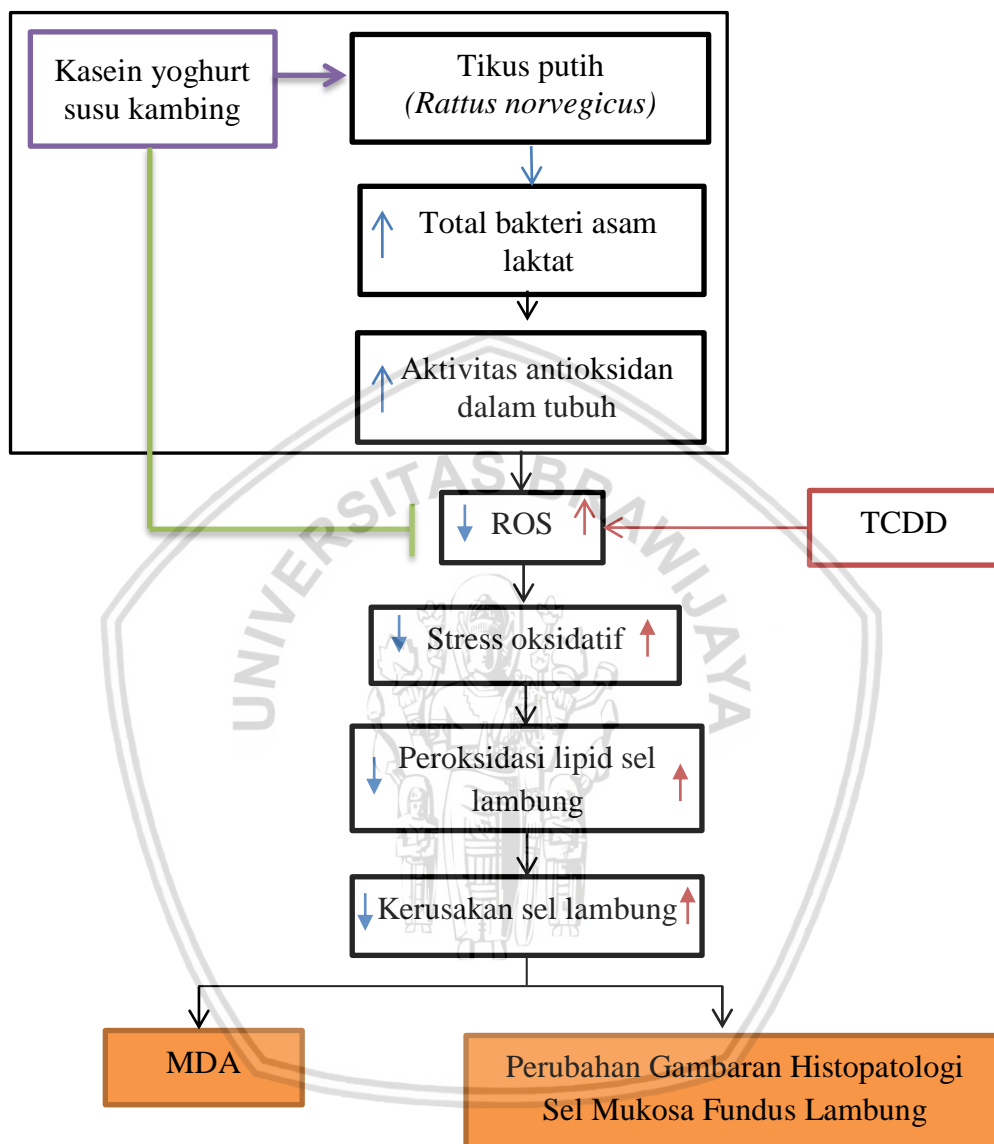
Jenis antioksidan terdiri atas dua jenis, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik (Gordon, 1990). Sumber antioksidan alami sudah diketahui keuntungannya yang umumnya kadar toksisitasnya rendah

(Cahyadi, 2006). Contoh dari antioksidan alami dapat berasal dari tumbuhan (senyawa fenolik, golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol) dan hewan salah satunya kasein dalam yoghurt susu kambing. Sedangkan contoh dari antioksidan sintetis adalah Butil Hidroksi Anisol (BHA) dan Butil Hidroksi Toluena (BHT). Penelitian yang telah dilakukan oleh Basma *et al.* (2011) berpendapat bahwa antioksidan sintetis (BHA dan BHT) dapat menyebabkan kerusakan pada hati dan karsinogenesis. Hal tersebut yang menyebabkan penelitian dan penggunaan antioksidan alami semakin meningkat.



## BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Teori



**Gambar 3.1** Skema Kerangka Teori

Keterangan :

→	Pemberian kasein yoghurt susu kambing
→	Pemberian Dioksin
⊥	Menginduksi
↓	Menghambat
□	Parameter yang diamati
↑	Efek paparan Dioksin
↓	Efek terapi yoghurt susu kambing

2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-*p*-dioksin (TCDD) yang dipaparkan ke dalam tubuh tikus putih (*Rattus norvegicus*) masuk kedalam sel mukosa lambung. Selanjutnya, TCDD masuk kedalam sitoplasma dan mengikat *aryl hydrocarbon receptor* (AhR). Kompleks ikatan AhR beserta dioksin akan mengalami konformasi perubahan dan translokasi menuju nukleus. Ikatan tersebut melakukan heterodimer dengan faktor transkripsi lain, yaitu *Ah receptor nuclear translocator* (Arnt). Ikatan heterodimer AhR atau Arnt kompleks akan berinteraksi dan berikatan dengan sisi interaksi DNA yang spesifik, yaitu *Dioxin-Responsive Enhancer Elements* (DRE) yang terletak di permukaan gen target. *Dioxin-Responsive Enhancer Elements* (DRE), AhR-responsive lain dan ikatan AhR kompleks akan menstimulasi berbagai faktor transkripsi pada inti sel. Heterodimer AhR-Arnt akan menginduksi gen sitokrom P450 dan menyebabkan peningkatan produksi sitokrom. Sitokrom akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang merupakan enzim khusus hasil dari aktivitas biokimia agen toksik seperti dioksin. Sitokrom terbentuk dan turut berperan dalam proses lanjut metabolisme TCDD.

*Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan senyawa bersifat oksidator kuat dan sangat reaktif berikatan dengan molekul disekitar, sehingga ROS dapat merusak molekul jaringan. Kehadiran radikal bebas ROS yang berlebih berpotensi merusak membran sel melalui serangkaian reaksi yang kompleks yang dikenal dengan peroksidasi lipid. Akhir dari reaksi ini, yaitu terputus rantai asam lemak menjadi MDA yang merupakan senyawa toksik terhadap sel. Tubuh yang sehat, dimana terjadi keseimbangan antara ROS dengan antioksidan yang dihasilkan didalam tubuh. Namun, dalam keadaan tertentu, produksi ROS



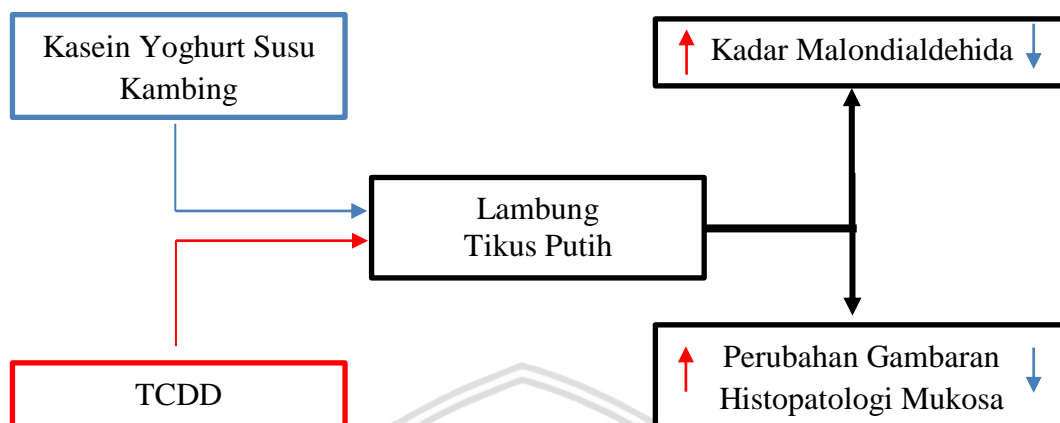
meningkat dan terjadi ketidakseimbangan antara ROS dengan antioksidan, maka terjadi stress oksidatif. Stress oksidatif terjadi apabila ROS yang dihasilkan lebih besar daripada yang dapat diredam oleh antioksidan alami dalam tubuh, sehingga sel mengalami kerusakan. Selain menyebabkan kerusakan pada mukosa lambung, radikal oksigen berpotensi toksik terhadap sel, menyebabkan peroksidasi lipid menyebabkan perubahan pada sekuens basa asam nukleat, sehingga dapat bermutasi dan menyebabkan kanker pada lambung. Selain itu, target utama serangan radikal bebas didalam tubuh berupa lipid, protein, karbohidrat, dan DNA yang menyebabkan gangguan pada berbagai bagian tubuh. *Reactive Oxygen Species* (ROS) bersifat sangat reaktif sehingga mampu mengikat molekul lipid, protein, dan DNA. Ketika ketiga molekul tersebut berikatan, maka akan mengalami disfungsi. Kerusakan sel mukosa lambung akibat terpapar TCDD disebabkan oleh kegagalan fungsi tersebut.

Stress oksidatif yang terjadi akibat akumulasi agen toksik TCDD juga dapat menyebabkan kehilangan fungsi sel dan kerusakan membran fosfolipid bilayer sel dengan pengolahan lipid peroksidase. Reaksi antara TCDD dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) yang ada di membran sel akan membentuk hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida menyebabkan dekomposisi produk senyawa aldehid, yaitu MDA.

Malondialdehida (MDA) merupakan salah satu parameter yang dipakai untuk menentukan kondisi stress oksidatif. Ada peningkatan dari MDA bersinergis dengan peningkatan aktivitas radikal bebas. Kadar MDA yang tinggi didalam tubuh dapat mengakibatkan jaringan normal rusak dan menyebabkan timbul stress oksidatif. Akumulasi radikal bebas di dalam lambung akan

menstimulasi aktifitas dari sel darah putih seperti sel monosit, sel neutrofil, dan sel T. Didalam lambung terdapat bakteri berbentuk batang yaitu *Helicobacter pylori*. Bakteri ini jika bertemu dengan sel darah putih, maka oksigen aktif pun terbentuk. Oksigen aktif akan menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang bereaksi dengan TCDD yang merupakan senyawa organoklorit. Hasil dari reaksi tersebut akan menjadi asam hipoklorit. Jika senyawa klor seperti ini terbentuk di dalam tubuh dan bereaksi dengan asam urat, selanjutnya terbentuk senyawa karsinogenik yang sangat beracun. Dari berbagai reaksi yang berkepanjangan akan mengakibatkan adaptasi sel dan perubahan gambaran histopatologi sel mukosa lambung.

Kasein yoghurt susu kambing merupakan antioksidan alternatif yang dapat meningkatkan kandungan antioksidan di dalam tubuh. Antioksidan yang terkandung dalam kasein yoghurt susu kambing dapat mencegah terjadi kerusakan sel mukosa lambung dari stress oksidatif akibat paparan TCDD. Antioksidan tambahan dari kasein akan menyeimbangkan ROS dengan antioksidan alami, sehingga stress oksidatif dapat ditekan yang menyebabkan lipid, DNA, dan protein pada jaringan menjadi seimbang. Radikal bebas yang kekurangan elektron akan stabil akibat tambahan elektron yang diberikan oleh antioksidan sehingga radikal bebas tidak berikatan dengan molekul lipid, protein, dan DNA pada sel mukosa lambung. Dengan pemberian kasein yoghurt susu kambing sebagai tindakan preventif diharapkan dapat mencegah terjadi peroksidasi lipid pada membran sel tubuh.



**Gambar 3.2** Skema Kerangka Konsep

Keterangan :   
 ↑ Efek pemberian TCDD   
 ↓ Efek pemberian kasein yoghurt susu kambing

### 3.2 Hipotesis penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut ini :

1. Pemberian preventif kasein yoghurt susu kambing dapat mencegah kenaikan kadar MDA lambung tikus putih (*Rattus novergicus*) yang dipapar TCDD.
2. Pemberian preventif kasein yoghurt susu kambing dapat mencegah kerusakan gambaran histopatologi lambung tikus putih (*Rattus novergicus*) yang dipapar dioksin.

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei sampai dengan bulan September 2017 di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya; Laboratorium Biosains, Universitas Brawijaya; Laboratorium Ilmu FAAL, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya; Laboratorium Teknik Pengolahan Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya; Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga.

### 4.2 Materi Penelitian

#### 4.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain *autoclave*, *Beaker glass* 100 ml, tabung *Erlenmeyer* 250 ml, tabung *Erlenmeyer* 500 ml, tabung *Erlenmeyer* 1000 ml, gelas ukur 500ml, pipet 1 ml, pipet 5 ml, pipet 10 ml, *aluminium foil*, *waterbath*, spatula, pH meter, inkubator, karet bulb, tisu, kompor gas, botol *Schott* 1000 ml, timbangan digital, corong kaca, kertas saring, sentrifus, tabung sentrifus 50 ml, kandang plastik ukuran 41 cm x 31 cm x 27 cm, penutup kandang kawat, serbuk kayu, tempat minum hewan coba, boks pakan, hewan coba, *disposable syringe* (1 ml dan 3 ml), alat sonde, pot organ, lemari es, spektrofotometer, mikroskop cahaya, kamera mikroskop,

mikrotube, *vortex*, *object glass*, *cover glass*, tempat untuk *staining*, dan *paraffin cassette*.

#### 4.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tikus putih (*Ratus norvegicus*) strain *Wistar*, jantan, berumur 8-12 minggu, dengan berat 150-250 gram sebanyak 24 ekor yang didapat dari Penyedia Hewan Laboratorium D'wistar, Jalan Deme Nomor 66 Gatot Subroto, Bandung, susu kambing Peranakan Etawa (PE) segar dari Surabaya Valenta Goat Milk, *starter yoghurt* (*Yógourmet Yoghurt Starter, LYO-SAN. INC 500 Aéoparc, C. P. 598, Lachute, QC. Canada, J8H 4G4*) yang mengandung bakteri *L. Bulgaricus*, *S. Thermophilus* dan *L. Acidophilus*, TCDD (2,3,7,8-TCDD Sigma 48599), air RO, pakan komersial (KSP 2, Comfeed Indonesia), *aquades*, TCA 1 %, TBA, HCL, nitrogen cair, NaCl fisiologis, minyak jagung, formaldehid 10 %, etanol 70 %, etanol 80 %, etanol 90 %, pewarna HE, dan parafin.

### 4.3 Tahapan Penelitian

#### 4.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba ini dibagi atas 6 kelompok yang terdiri dari kelompok normal, kelompok kontrol kasein (kasein yoghurt susu kambing dosis 600 mg/kg BB), kelompok positif (TCDD dosis 100 ng/kg BB), kelompok perlakuan 1 (kasein yoghurt susu kambing 300 mg/kg BB dan TCDD 100 ng/kg BB), kelompok perlakuan 2 (kasein yoghurt susu kambing

600 mg/kg BB dan TCDD 100 ng/kg BB) dan kelompok perlakuan 3 (kasein yoghurt susu kambing 900 mg/kg BB dan TCDD 100 ng/kg BB).

**Tabel 4.1** Rancangan Penelitian

Kelompok Tikus	Perlakuan
Normal	Kelompok tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) sehat tanpa diberi perlakuan apapun, hanya diberi pakan komersial dan air minum secara <i>ad libitum</i>
Kasein	Kelompok tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang diberi kasein yoghurt susu kambing dengan dosis 600 mg/kg BB per-oral selama 21 hari
Positif	Kelompok tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang dipapar TCDD dengan dosis 100 ng/kg BB per-oral selama 21 hari.
1	Kelompok tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang diberi kasein yoghurt susu kambing dengan dosis 300 mg/kg BB selama 21 hari dan dipapar TCDD dengan dosis 100 ng/kg BB selama 21 hari.
2	Kelompok tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang diberi kasein yoghurt susu kambing dengan dosis 600 mg/kg BB selama 21 hari dan dipapar TCDD dengan dosis 100 ng/kg BB selama 21 hari.
3	Kelompok tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang diberi kasein yoghurt susu kambing dengan dosis 900 mg/kg BB selama 21 hari dan dipapar TCDD dengan dosis 100 ng/kg BB selama 21 hari.

Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus menurut Soehono (2016).

$$P(n-1) \geq 20$$

P = jumlah kelompok (terdiri dari 6 macam perlakuan)

$$6(n-1) \geq 20$$

n = jumlah ulangan yang dibutuhkan

$$6n-6 \geq 20$$

$$6n \geq 26$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan diatas, jumlah ulangan yang dibutuhkan adalah 4 kali ulangan, sehingga untuk 6 perlakuan dengan 4 kali ulangan dalam setiap kelompok, dibutuhkan 24 ekor hewan coba.



#### 4.3.2 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam melaksanakan penelitian ini adalah:

- Variabel bebas : TCDD (dosis 100 ng/kg BB) dan kasein yoghurt susu kambing (dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB dan 900 mg/kg BB)
- Variabel tergantung : kadar MDA dan gambaran histopatologi lambung
- Variabel kendali : umur, jenis kelamin, berat badan, pakan, air minum, dan kondisi kandang tikus putih (*Rattus novergicus*)

#### 4.4 Prosedur Kerja

##### 4.4.1 Pembuatan Kasein

##### 4.4.1.1 Pembuatan *Starter Cair (Mother Culture)*

Prosedur pembuatan *strarter* cair (*mother culture*) dilakukan dengan menggunakan metode Posecion *et. al.*, (2005) yang telah dimodifikasi. Susu kambing PE Sebanyak 70 ml dipasteurisasi dengan suhu 72<sup>0</sup>C selama 5 menit, dengan cara 70 ml susu kambing PE dituangkan ke dalam tabung *Erlenmeyer* 250 ml kemudian dipanaskan dalam air mendidih hingga mencapai suhu 72<sup>0</sup>C. Tabung *Erlenmeyer* yang berisi susu tadi dipindahkan dalam *waterbath* dengan suhu 72<sup>0</sup>C selama 5 menit. Susu kambing PE yang sudah dipasteurisasi, kemudian didiamkan hingga mencapai suhu 45<sup>0</sup>C. Selanjutnya, susu kambing PE diinokulasikan dengan *starter* yoghurt sebanyak 0,35 gram dan dihomogenisasi.

Kemudian diinkubasi pada suhu  $45^{\circ}\text{C}$  selama 4 jam hingga mencapai pH 4,4 sampai 4,5. *Strarter* cair (*mother culture*) ditutup dengan *aluminium* foil untuk menghindari ada kontaminasi dan disimpan dalam lemari es dengan suhu  $< 4^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4.1.2 Pembuatan Yoghurt

Proses pembuatan yoghurt menggunakan metode Posecion *et. al.*, (2005) yang sudah dimodifikasi. Susu kambing PE sebanyak 480 ml dimasukkan kedalam tabung *Erlenmeyer* 500 ml, kemudian dipasteurisasi selama 5 menit dengan metode yang sama dengan pembuatan *strarter* cair (*mother culture*). Susu kambing PE yang telah dipasteurisasi, kemudian didiamkan hingga mencapai suhu  $45^{\circ}\text{C}$ . Diinokulasikan *strarter* cair (*mother culture*) dengan konsentrasi 3% kedalam susu kambing PE 480 ml yang telah dipasteurisasi, dan dihomogenkan. Diinkubasi pada suhu  $45^{\circ}\text{C}$  selama 2 sampai 3 jam sampai pH mencapai 4,5 sampai 5.

#### 4.4.1.3 Pembuatan Kasein Yoghurt Susu Kambing

Yoghurt susu kambing yang telah dibuat, kemudian disentrifus pada kecepatan 1200 rpm selama 10 menit pada suhu  $5^{\circ}\text{C}$  dan disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan kasein dengan *water soluble extract*. Kasein yang didapat dari hasil penyaringan, kemudian dilakukan *freeze drying* untuk menjaga kestabilan pH (Padaga, 2009).

#### 4.4.2 Persiapan Hewan Coba Dipapar 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)

##### 4.4.2.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dibagi dalam 6 kelompok perlakuan. Sebelum mendapat perlakuan, semua tikus putih (*Rattus norvegicus*) diadaptasikan dengan kondisi kandang selama 7 hari dan diberi pakan *ad-libitum* komersial berupa KSP 2 dengan komposisi: kadar air maksimal 12%; protein kasar minimal 16%; lemak kasar 3-7%; serat kasar maksimal 8%; abu maksimal 10%; kalsium 0,8-1%; fosfor 0,6-0,8%. Air minum diberikan *ad-libitum*. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dipelihara dalam kandang plastik ukuran 41 cm x 31 cm x 27 cm dengan populasi 2 ekor/kandang dalam suatu bersuhu 25-26°C.

##### 4.4.2.2 Hewan Coba Dipapar dengan 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)

Paparan TCDD menggunakan metode Wati dkk., (2014) yang dimodifikasi. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberikan TCDD dengan dosis 100ng/kg BB yang telah dilarutkan dalam minyak jagung sebanyak 1 ml per-oral dengan sonde lambung setiap hari pada pukul 14.00 WIB selama 21 hari. Dosis TCDD ditentukan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Fujimaki *et al.*, (2002) dan Yin *et al.*, (2012). Perhitungan dosis TCDD dapat dilihat di **Lampiran 6**.

#### 4.4.2.3 Pemberian Kasein Yoghurt Susu Kambing

Dosis pemberian kasein yoghurt susu kambing berdasarkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Irawan dkk., (2014), yaitu sebanyak 300-900 mg/kg BB. Dosis kasein yoghurt susu kambing yang digunakan pada penelitian ini, yaitu 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB yang dilarutkan dengan air RO sebanyak 1 ml per oral dengan sonde lambung setiap hari pada pukul 10.00 WIB selama 21 hari. Perhitungan dosis kasein yoghurt susu kambing dapat dilihat di **Lampiran 5**.

#### 4.4.3 Pengambilan Organ Lambung

Pengambilan organ dilakukan setelah hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) dieutanasia dengan cara dislokasi leher. Tikus putih (*Rattus novergicus*) yang sudah dieutanasi diletakkan pada sterofoam pada posisi dorsal, kemudian dilakukan fiksasi pada keempat ekstremitas menggunakan jarum pentul. Selanjutnya dilakukan pembedahan bagian abdomen untuk diambil dan dilakukan pencucian organ lambung menggunakan NaCl fisiologis, yang bertujuan untuk menghilangkan darah. Nekropsi dilakukan tepat pada linea alba dengan membuka kulit dan fascia. Setelah rongga abdomen terbuka, dilakukan pengambilan organ lambung dan dimasukkan kedalam larutan formaldehid 10% untuk pembuatan histopatologi dan sebagian yang lainnya dibungkus dengan *aluminium foil*, dicelupkan kedalam nitrogen cair selama 10 detik, kemudian disimpan didalam lemari es pada suhu 2°C sebagai bahan untuk pemeriksaan kadar MDA.

#### 4.4.4 Pengukuran Kadar Malondialdehida (MDA) Lambung

Prosedur pengukuran kadar MDA lambung menggunakan metode Aulanni'am *et. al.*, (2013) yang dimodifikasi. Pengukuran kadar MDA dengan metode TBA menggunakan organ lambung yang di potong kecil-kecil, digerus, kemudian dilakukan homogenisasi dengan mensentrifus pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan diukur absorbansi dengan spektrofotometer pada  $\lambda=532$  nm. Prosedur lebih lengkap dapat dilihat di **Lampiran 7**.

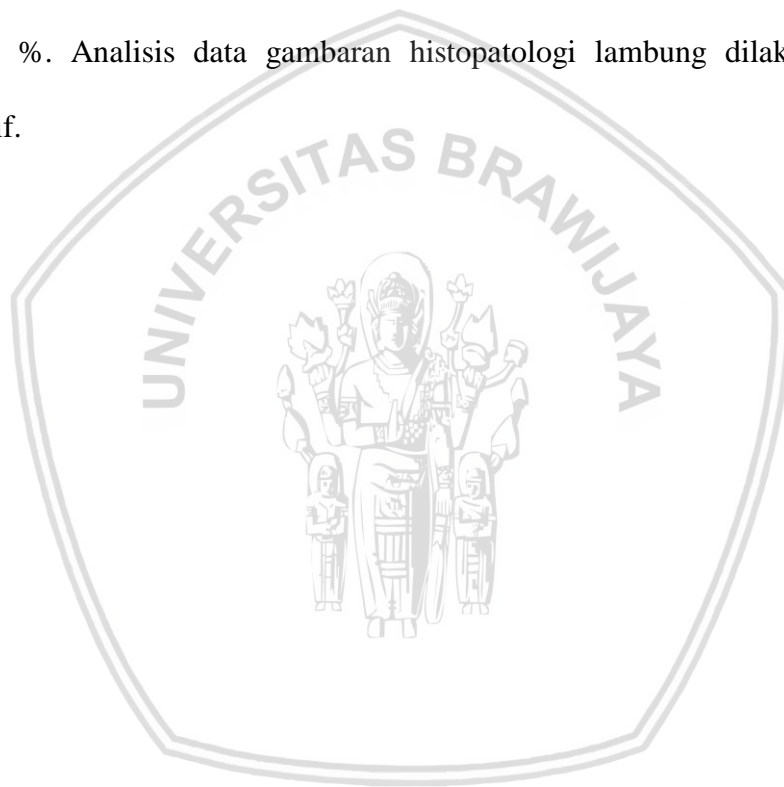
#### 4.4.5 Pembuatan dan Pembacaan Preparat Histopatologi Lambung

Pembuatan preparat histopatologi lambung tikus Tikus putih (*Rattus norvegicus*) menggunakan metode dari Amin dkk., (2009) dengan menggunakan pewarnaan HE. Lambung hasil pembedahan direndam dalam larutan formaldehid 10%. Pembuatan preparat histopatologi lambung dilakukan secara berurutan dimulai dari fiksasi, dehidrasi, infiltrasi, *embedding*, pemotongan, penempelan pada *object glass* dan pewarnaan HE. Prosedur lebih lengkap dapat dilihat di **Lampiran 8**.

Pembacaan preparat histopatologi lambung dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 100x, 200x dan 400x yang ditampilkan di layar monitor. Pengambilan gambar histopatologi menggunakan kamera setelah mendapatkan gambar yang diinginkan. Pengamatan histopatologi yang diamati berupa erosi sel mukosa lambung.

#### 4.5 Analisis Statistik

Analisis data untuk kadar MDA dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan uji statistik *one way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan menggunakan *software* Microsoft Office Excel dan SPSS untuk windows bertujuan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Jika antar perlakuan berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) untuk mengetahui pengaruh terapi yoghurt susu kambing terhadap kadar MDA dengan  $\alpha = 0,05$  %. Analisis data gambaran histopatologi lambung dilakukan secara deskriptif.





## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh Pemberian Kasein Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) Lambung Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek preventif pemberian kasein yoghurt susu kambing terhadap kadar MDA lambung tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD) menunjukkan perbedaan yang nyata dari masing-masing kelompok perlakuan yang dapat dilihat pada **Tabel 5.1**. Hasil pengujian kadar MDA dengan analisa statistika menggunakan uji *one way* ANOVA yang kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur atau *Tukey* dengan tingkat kepercayaan 95% secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 10**. Rata-rata nilai kadar MDA lambung tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok perlakuan dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.

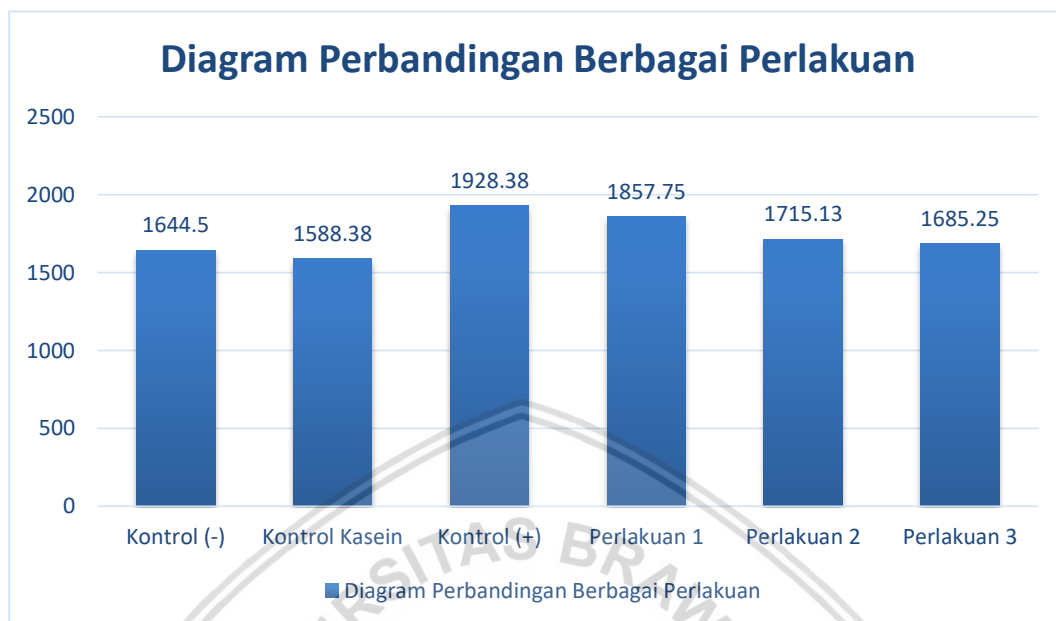
**Tabel 5.1** Kadar MDA (ng/ml) Lambung Tikus (*Rattus norvegicus*) pada Berbagai Perlakuan

Kelompok	Rata-Rata Kadar MDA (ng/ml)	Penurunan Kadar MDA terhadap Kontrol Positif (%)
Kontrol negatif (Sehat) (A)	1644,50±89,09 <sup>a</sup>	14,72 %
Kontrol kasein (Kasein 600 mg/kgBB) (B)	1588,38±76,63 <sup>a</sup>	17,63 %
Kontrol positif (TCDD 100 ng/kgBB) (C)	1928,38±116,10 <sup>c</sup>	-
Perlakuan 1 (TCDD 100 ng/kgBB+ kasein 300 mg/kgBB) (D)	1857,75±97,01 <sup>bc</sup>	3,66 %
Perlakuan 2 (TCDD 100 ng/kgBB+ kasein 600 mg/kgBB) (E)	1715,13±77,45 <sup>ab</sup>	11,06 %
Perlakuan 3 (TCDD 100 ng/kgBB+ kasein 900 mg/kgBB) (F)	1685,25±80,35 <sup>ab</sup>	12,61 %

**Keterangan :** Nilai kadar MDA dengan notasi berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan.

Hasil penelitian yang didapatkan menunjukkan bahwa pemberian kasein yoghurt susu kambing pada tikus putih (*Rattus novvergicus*) dapat mencegah kenaikan kadar MDA dan memberikan hasil yang nyata ( $p < 0,05$ ). Analisa uji *one way* ANOVA menunjukkan bahwa pemberian kasein yoghurt susu kambing dapat mencegah peningkatan kadar MDA pada tikus putih (*Rattus novvergicus*) yang terpapar TCDD ( $p < 0,05$ ), hal ini ditunjukkan dengan adanya 4 notasi pada uji lanjutan *Tukey* (**Tabel 5.1**). Hasil uji *Tukey* menunjukkan pada kelompok kontrol negatif berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan 1, namun tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 2 dan 3, dan bernotasi sama dengan kelompok kontrol kasein. Pada kelompok kontrol positif berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol kasein, kelompok perlakuan 2 dan 3, namun tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 1. Kelompok kontrol kasein berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan 1, tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 2 dan 3, dan bernotasi sama dengan kelompok kontrol negatif. Pada kelompok perlakuan 1 berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif dan kontrol kasein, sedangkan tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 2 dan 3. Kelompok perlakuan 2 tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol kasein, kelompok kontrol negatif, dan kelompok perlakuan 1, namun berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif, dan memiliki notasi yang sama dengan kelompok perlakuan 3. Pada kelompok perlakuan 3 berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif, tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol kasein, dan mempunyai notasi yang sama dengan kelompok perlakuan 2 (**Tabel 5.1**).

**Gambar 5.1** Diagram Perbandingan Kadar MDA (ng/ml) Lambung Tikus (*Rattus novergicus*) pada Berbagai Perlakuan



Berdasarkan **Tabel 5.1** diketahui nilai kadar MDA lambung pada kelompok kontrol negatif adalah  $1644,50 \pm 89,09$  ng/ml. Nilai kelompok kontrol negatif merupakan standar nilai kadar MDA tikus putih (*Rattus novergicus*) dalam keadaan normal yang dimana tikus tidak diberikan TCDD. Kadar MDA lambung kelompok kontrol positif adalah  $1928,38 \pm 116,10$  ng/ml, menunjukkan perbedaan yang nyata dibandingkan kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol kasein, kelompok perlakuan 2 dan 3. Menunjukkan dimana menurut Doi *et. al.*, (2013), paparan TCDD akan memicu terbentuk *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga menyebabkan stress oksidatif pada lambung. Stress oksidatif akan mengakibatkan kerusakan jaringan lipid yang berkorelasi langsung dengan kadar Malondialdehida yang merupakan produk dari peroksidasi lipid (Reilly, *et al.*, 1991).

Kadar MDA organ lambung pada kelompok kontrol kasein (B) adalah  $1588,38 \pm 76,63$  ng/ml. Berdasarkan hasil uji *Tukey* rata-rata kelompok kontrol kasein memiliki notasi yang sama dengan kelompok kontrol negatif. Namun,

menurut presentase dari perhitungan rata-rata dan dari perbandingan diagram (**Gambar 5.1**) menunjukkan terdapat penurunan kadar MDA dibandingkan kelompok kontrol negatif (A) yaitu sebanyak 2,91%. Kadar MDA yang ditunjukkan pada hasil pemeriksaan membuktikan bahwa dalam keadaan tubuh tikus yang sehat masih terdapat kandungan radikal bebas yang didukung dari pernyataan Guyton & Hall (1996) yaitu, konsekuensi dari proses metabolisme tersebut sistem biokimiawi (oksidasi biologi) dalam tubuh mampu menghasilkan radikal bebas sebanyak 2.5% dari total kebutuhan oksigen atau sebanyak 3.4 kg/24 jam. Meskipun dapat menurunkan kadar MDA, pada hasil statistik menunjukkan notasi yang sama yang berarti tidak berpengaruh kasein terhadap penurunan kadar MDA pada kontrol negatif. Hal ini disebabkan, tubuh pada kontrol negatif dinyatakan sehat karena kandungan antioksidan yang seimbang dengan adanya radikal bebas yang ada pada tubuh sehingga antioksidan alami berperan dan masih mampu mengatasinya.

Perlakuan yang dilakukan pada kontrol kasein (B) yaitu diberikan kandungan kasein yoghurt susu kambing dengan dosis 600 mg/kg BB yang dimana mengharapkan adanya efek perubahan kadar MDA dari induksi preventif yang diberikan. Hasil analisa statistik kadar MDA menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ( $p < 0,05$ ) dimana rata-rata kadar MDA kontrol kasein (C) ( $1588,38 \pm 76,63$  ng/ml) sedangkan rata-rata kelompok kontrol negatif (A) ( $1644,50 \pm 89,09$  ng/ml). Hal ini membuktikan bahwa kandungan antioksidan dalam kasein efektif dalam menstabilkan radikal bebas yang sangat reaktif dalam TCDD yang ditunjukkan penurunan kadar MDA pada kelompok kontrol kasein. Keefektifan dari antioksidan dalam kasein yoghurt susu kambing akan

diujikan berdasarkan kenaikan kadar kasein yang diberikan pada kelompok perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3.

Penelitian yang dilakukan pada kelompok perlakuan 1 (D) memiliki kadar MDA pada organ lambung dengan pemberian preventif kasein yoghurt susu kambing 300 mg/kgBB dan TCDD 100 ng/kgBB yaitu  $1857,75 \pm 97,01$ , menunjukkan menunjukkan perbedaan tidak nyata ( $p < 0,05$ ) dibandingkan dengan rata-rata kelompok positif (C). Hal ini menunjukkan rata-rata kadar MDA pada kelompok perlakuan 1 (D) dengan rata-rata kelompok positif (C) sama meskipun terjadi penurunan rata-rata kadar MDA pada kelompok perlakuan 1 (D). Berdasarkan data tersebut, menunjukkan kasein yoghurt susu kambing berperan sebagai antioksidan yang mencegah kenaikan kadar MDA pada lambung walaupun pada kadar preventif 300 mg/kgBB belum menunjukkan rata-rata kadar MDA yang mendekati kadar MDA pada kelompok kontrol negatif (A).

Penelitian yang dilakukan pada kelompok perlakuan 2 (E) memiliki kadar MDA pada organ lambung dengan pemberian preventif kasein yoghurt susu kambing 600 mg/kgBB dan TCDD 100 ng/kgBB yaitu  $1715,13 \pm 77,45$ . Berdasarkan uji *Tukey* menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dengan persentase penurunan kadar MDA sebesar 11,06% yang didukung pula dari perbandingan diagram (**Gambar 5.1**). Namun memiliki notasi yang sama pada kelompok perlakuan 2 ini sama dengan kelompok perlakuan 3.

Pada perlakuan 3 (F) dengan pemberian preventif kasein yoghurt susu kambing 900 mg/kgBB dan TCDD 100 ng/kgBB yang memiliki kadar MDA

1685,25±80,35 yang tidak berbeda nyata bila dibandingkan dengan kadar MDA pada kontrol negatif, kontrol kasein, dan kelompok perlakuan 1. Kadar MDA pada perlakuan 3 (F) mengalami penurunan sebesar 12,61% dan memiliki notasi yang berbeda nyata bila dibandingkan dengan kontrol positif. Berdasarkan hasil uji *Tukey* rata-rata kelompok perlakuan 2 dengan kelompok perlakuan 3 memiliki notasi yang sama dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok perlakuan dengan terapi kasein yoghurt 600 mg/kgBB (E) dan 900 mg/kgBB (F) sama-sama memiliki efek penurunan kadar MDA organ lambung yang sama.

Kelompok perlakuan dengan terapi kasein yoghurt susu kambing 600 mg/kgBB (E) dan 900 mg/kgBB (F) menunjukkan penurunan kadar MDA organ lambung dikarenakan yoghurt susu kambing mengandung peptida bioaktif yang bekerja sebagai antioksidan melalui proses penghambatan peroksidasi lipid dengan *scavenger* (perangkap) radikal bebas. Hal ini sesuai dengan pernyataan Korhonen & Pihlanto (2006), bahwa peptida bioaktif yoghurt susu kambing dapat menurunkan kadar MDA melalui penghambatan peroksidasi lipid secara enzimatik dan nonenzimatik.

Awal mula pengaruh TCDD terhadap lambung diawali dari TCDD yang dipapar pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) masuk kedalam tubuh dan masuk kedalam sel otot lambung yang mengikat AhR di sitoplasma. Ikatan tersebut membentuk senyawa kompleks baru dengan AhR *Nuclear Translokator* (ARNT), kemudian berinteraksi dengan *Dioxin-Responsive Enhancer Elements* (DRE) yang terletak pada permukaan gen target dan mengaktifkan berbagai faktor transkripsi pada inti sel. Heterodimer AhR-Arnt menginduksi gen



sitokrom P450 dan menyebabkan peningkatan produksi sitokrom. Sitokrom P450 akan menghasilkan ROS yang merupakan enzim khusus hasil dari aktivitas biokimia agen toksik. Apabila keseimbangan antara antioksidan dengan peningkatan ROS terganggu, maka terjadi kondisi stress oksidatif di jaringan lambung. *Reactive Oxygen Species* (ROS) menyebabkan peroksidasi lipid, akibat dari reaksi tersebut adalah terputus rantai asam lemak dan menghasilkan senyawa toksik bagi sel, yaitu MDA (Brunner *et al.*, 2004).

Stress oksidatif menimbulkan terjadi peroksidasi lipid pada lambung yang dapat merusak organel sel dan fungsi membran sel dari lambung. Menurut Grotto *et al.*, (2009), peroksidasi lipid terjadi ketika radikal bebas bereaksi dengan *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) sebagai komponen penyusun membran sel. PUFA tersebut memiliki ikatan ganda pada karbon-karbon yang menjadi target utama dari radikal bebas. Proses peroksidasi lipid dari radikal bebas akan selalu membentuk reaksi berantai yang akan terus berlanjut hingga menghasilkan radikal peroksidasi lipid, hidroperoksida, dan produk aldehida contohnya, MDA (Arkhaesi, 2008; Hemalatha *et al.*, 2013; dan Jimenez *et al.*, 2007).

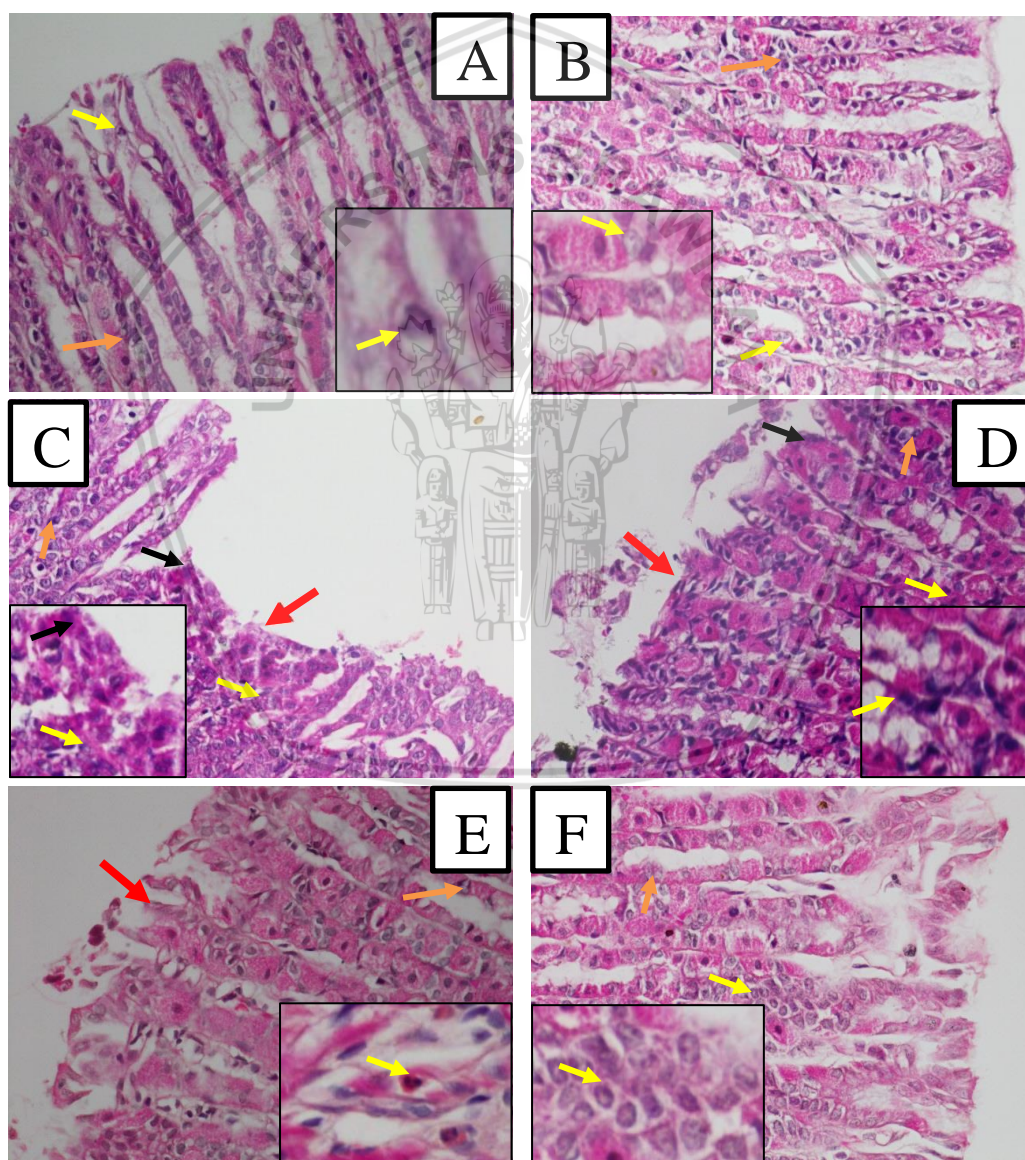
Peran dari kasein yoghurt susu kambing yaitu akan mencegah proses pembentukan radikal bebas dengan mekanisme penghambatan oksidasi radikal bebas dalam sel mukosa lambung. Peptida bioaktif dalam kandungan kasein yoghurt susu kambing dapat menstabilkan radikal superoksida ( $O_2$ ). Kullisaar *et al.*, (2003) dan Liu *et al.*, (2005), berpendapat bahwa peptida bioaktif susu kambing yang terfermentasi akan menstabilkan radikal superoksida dengan mendonorkan atom hidrogen (H). Radikal superoksida yang tertangkap oleh

peptida bioaktif kasein yoghurt susu kambing akan mencegah proses pembentukan radikal lipid yang sifatnya tidak stabil karena kehilangan satu atom hidrogen (H) dari molekul lipid dan menghambat transfer elektron molekul oksigen pada radikal peroksil juga mencegah propagansi sehingga radikal bebas tidak dapat bereaksi dengan oksigen yang disertai adanya penurunan produksi MDA.



## 5.2 Pengaruh Pemberian Kasein Yoghurt Susu Kambing Terhadap Gambaran Histopatologi Lambung Tikus Putih (*Rattus novergicus*) yang Dipapar 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)

Untuk mengetahui pengaruh terapi preventif kasein yoghurt susu kambing dalam mencegah adanya kerusakan sel mukosa lambung dilakukan pengamatan histopatologi menggunakan mikroskop Nikon H600L. Hasil pengamatan dapat dilihat pada **Gambar 5.2**.



**Gambar 5.2** Histopatologi mukosa lambung tikus putih (sediaan lambung ; potongan melintang; pewarnaan HE. Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel).

Keterangan :

(A) Tikus kontrol negatif; (B) Tikus kontrol kasein; (C) Tikus kontrol positif; (D) Tikus dosis terapi kasein 300 mg/kgBB; (E) Tikus dosis terapi kasein 600 mg/kgBB; (F) Tikus dosis terapi kasein 900 mg/kgBB; (↑) erosi epitel mukosa lambung; (↑) infiltrasi sel neutrofil; (↑) nekrosis piknotik; (↑) sel chief

Gambaran histologi lambung dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) (**Gambar 5.2**). Berdasarkan pengamatan pada gambar preparat lambung kelompok kontrol negatif (tikus sehat) (**Gambar 5.2. A**) menunjukkan pada bagian mukosa terlihat adanya epitel kolumnar simplek dengan sel parietal dan sel chief yang masih tertata dan berjajar rapi dengan bentuk silindris simplek. Hal ini sesuai dengan pendapat Puspitasari (2008), sel chief bersifat basofilik karena banyak mengandung mitokondria dan granula untuk memproduksi enzim pepsinogen, sedangkan sel parietal bersifat asidofilik karena sel ini memproduksi HCL atau asam lambung. Morfologi sel parietal yang berbentuk bulat telur dan besar adalah normal. Terlihat juga masih adanya sel neutrofil dalam jumlah sedikit yang masih normal karena neutrofil memiliki peran untuk melawan agen-agen asing yang bersifat patogen.

Berbeda dengan gambaran histopatologi pada kelompok kontrol positif (**Gambar 5.2. C**) yang menunjukkan kerusakan sel yang berat. Senyawa TCDD dapat meningkatkan kadar ROS yang terdapat pada lambung. Melalui perantara ROS, TCDD akan menyebabkan peroksidasi lipid pada membran sel dan akan membentuk radikal lipid. Radikal lipid yang terbentuk akan berikatan dengan oksigen dan membentuk rantai radikal bebas sehingga mengakibatkan stress oksidatif. Induksi TCDD menyebabkan stress oksidatif dimana suatu kondisi ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan, merupakan mekanisme etiologis yang penting dari banyak penyakit (Ciftci *et. al.*, 2011; Yoshida *and*



Ogawa, 2000). Akibat adanya stress oksidatif dapat mengarah pada adanya kerusakan pada mukosa lambung. Pada gambaran histopatologi terlihat adanya erosi pada epitel yang disertai infiltrasi sel radang (neutrofil) jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Erosi yang terjadi pada mukosa lambung sebagai efek dari adanya radikal bebas yang menstimulasi sel darah putih menuju sel mukosa lambung yang terlihat banyak pada gambaran histopatologi. Sel darah putih akan menghasilkan  $H_2O_2$  untuk membunuh beberapa jenis bakteri dan jamur serta untuk pertumbuhan sel, namun ia tidak menyerang sasaran spesifik, sehingga ia juga akan menyerang asam lemak tidak jenuh ganda dari membran sel, organel sel, atau DNA, sehingga dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel (Winarti, 2007). Terlihat adanya infiltrasi sel radang yang melibatkan sel inflamasi seperti neutrofil, limfosit, monosit, dan makrofag, namun sel-sel radang yang mendominasi adalah neutrofil.

Neutrofil adalah jenis sel leukosit yang paling banyak dalam bagian sel darah putih yaitu 50-70% diantara sel leukosit yang lain. Terdapat 2 macam neutrofil yaitu neutrofil batang dan (Stab) dan neutrofil segmen (Polimorfonuklear) (Kiswari, 2014). Perbedaan dari keduanya yaitu neutrofil batang merupakan bentuk muda dari neutrofil segmen yang sering disebut sebagai neutrofil tapal kuda yang mempunyai inti bentuk tapal kuda. Seiring dengan proses terjadinya pematangan, bentuk intinya akan bersegmen dan akan menjadi neutrofil bersegmen. Menurut Riswanto (2013), sel itu mempunyai sitoplasma luas berwarna pink pucat dan granula halus berwarna ungu. Neutrofil berfungsi sebagai garis pertahanan tubuh terhadap zat asing terutama terhadap bakteri. Sirkulasi neutrofil dalam darah yaitu sekitar 10 jam dan dapat hidup

selama 1-4 hari pada saat berada dalam jaringan ekstrasvaskuler (Kiswari, 2014). Menurut Fournier (2012), neutrofil bertanggung jawab dalam proses penarikan sel-sel inflamasi lainnya untuk melokalisir terjadinya kerusakan dengan melepaskan sitokin pro-inflamasi, selain itu neutrofil juga berperan dalam perbaikan mukosa. Satu jam setelah terjadi luka pada jaringan, neutrofil akan tertarik dan menjadi sel dominan pada jaringan yang luka selama 2 hari pertama dan jumlahnya akan meningkat pada hari kedua. Neutrofil akan menfagositosis sel yang rusak dan membunuh bakteri, selain itu neutrofil akan mengeluarkan protease untuk memecah jaringan yang rusak, selanjutnya neutrofil akan mengalami apoptosis (kematian sel terprogram) dan di degradasi oleh makrofag (Martin and Leibovich, 2005).

Kerusakan sel mukosa lambung oleh TCDD juga mengakibatkan adanya nekrosis. Nekrosis adalah kematian sel yang disebabkan keadaan patologik dan bersifat irrevesibel (Tambayong, 2000). Nekrosis yang terlihat adalah nekrosis piknotik dimana inti sel tampak berwarna gelap dan mengkerut karena DNA berkorelasi menjadi massa yang padat. Menurut Hidayat dkk. (2013), terjadinya paparan zat yang dapat menimbulkan radikal bebas secara terus menerus akan mengakibatkan nekrosis dan kerusakan sel.

Gambaran histopatologi pada kelompok perlakuan 1 (**Gambar 5.2. D**) dengan pemberian terapi kasein yoghurt 300 mg/kgBB tidak berbeda jauh dengan gambaran kelompok kontrol positif (**Gambar 5.2. C**) hanya terlihat berkurangnya erosi pada epitel sel mukosa lambung dan masih terlihat adanya nekrosis piknotik walaupun tidak sebanyak kelompok kontrol positif. Pada kelompok perlakuan 2 (**Gambar 5.2. E**) dengan terapi kasein 600 mg/kgBB



menunjukkan adanya perbaikan dari erosi epitel, tidak adanya nekrosis piknotik, dan disertai berkurangnya sel radang bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1. Pada kelompok perlakuan 3 (**Gambar 5.2. F**) dengan dosis terapi kasein yoghurt 900 mg/kgBB, nekrosis piknotik dan erosi epitel sudah jauh berkurang menunjukkan hasil yang lebih baik bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan 3 dan menunjukkan hasil sama persis dengan lambung tikus yang sehat. Berdasarkan hasil pengamatan pada perlakuan terapi kasein yoghurt 900 mg/kgBB merupakan dosis yang paling efektif dalam menurunkan efek yang ditimbulkan akibat TCDD.

Gambaran histopatologi pada kelompok kontrol kasein (**Gambar 5.2. B**) dengan terapi kasein yoghurt 600 mg/kgBB, menunjukkan hasil yang sama baiknya dengan kelompok kontrol negatif. Tujuan dilakukan uji kontrol kasein untuk melihat efek yang hanya diberikan kasein saja. Telah terbukti bahwa kasein yoghurt susu kambing berperan sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Kandungan didalamnya mengandung peptida bioaktif dan bakteri asam laktat yang berperan dalam mengeliminasi mikroba patogen (Pessione and Simona, 2016). Kasein susu kambing yang bertindak sebagai antioksidan mengubah radikal peroksil (hasil peroksidasi lipid) menjadi kurang reaktif dan memutus reaksi radikal bebas yang berantai (Jetawattana, 2005).

## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian terapi preventif kasein yoghurt susu kambing dengan dosis 600mg/kg BB dan 900mg/kg BB mempunyai pengaruh yang sama dalam mencegah peningkatan kadar malondialdehida (MDA) organ lambung tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar TCDD dan merupakan dosis terbaik berdasarkan analisis statistik *Tukey*.
2. Pemberian terapi preventif kasein yoghurt susu kambing dengan dosis 900mg/kg BB mengandung bioaktif peptida yang mampu mencegah kerusakan fundus lambung tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar TCDD yang ditunjukkan dengan berkurangnya erosi pada epitel fundus lambung, tidak adanya nekrosis piknotik, dan infiltrasi sel radang yang sedikit.

### 6.2 Saran

Perlu diperhatikan dalam pemberian sonde lambung yoghurt agar tidak sampai melukai mukosa lambung supaya tidak mempengaruhi hasil histopatologi lambung dan diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kandungan kasein antioksidan kasein yoghurt susu kambing dengan whey yoghurt susu kambing.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Anti Fertilitas*. Jakarta : Adabia Press. 4-5.
- Aliaga, I. L., M. J. M. Alferez., M. Barrioneuvo., T. Nestares., M. R. S. Sampelayo and M. S. Campos. 2003. Study Of Nutritive Utilization Of Protein And Magnesium In Rats With Resection FF The Distal Small Intestine. Beneficial Effect Of Goat Milk. *J. Dairy Science* 86: 2968-2966.
- Amin, M.H.F, A.P.W. Marhendra dan Aulanni'am. 2009. *Pengaruh Paparan Lipopolosakarida pada Rongga Mulut dan Assisted Drainage Therapy (Adt) terhadap Kadar S-Ige dan Profil Radikal Bebas Pada Tikus Asma*, Paper Presentasi pada Seminar Nasional Biologi XX dan Kongres PBI XIV UIN Maliki, Malang, 24-25 Juli.
- Arkhaesi, N. 2008. *Kadar Malondialdehida (MDA) Serum Sebagai Indikator Prognosis Keluaran Pada Sepsis Neonatorum* [Tesis]. Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedik dan Program Pendidikan Dokter Spesialis-I Ilmu Kesehatan Anak. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Aritonang, V.P. 1999. *Insinerator Sumber Dioksin*. Ekolita: Majalah Manajemen Mutu, Lingkungan, dan Appraisal (Edisi 5). Jakarta.
- ATSDR, 1998. *Draft Update Toxicological Profile for Chlorinated Dibenzo-p-dioxins*.
- Aulanni'am, Vivi Shofia dan Chanif Mahdi. 2013. Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut Coklat (Sargassum Prismaticum) Terhadap Kadar Malondialdehida Dan *Gambaran Histologi Jaringan Ginjal Pada Tikus (Rattus Norvegicus) Diabetes Melitus Tipe 1*. Kimia student journal, vol 1, no. 1, pp. 119-125 Universitas Brawijaya Malang
- Ayala A., Munaz MF., Arguelles S. *Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signalling Mechanism of Malondialdehida and 4-Hydroxy-2-Noneal. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2014 (2014). Article ID 360438, 31 pages.
- Birnbaum LS, Cummings AM. *Dioxins And Endometriosis: A Plausible Hypothesis*. Environ Health Perspect 2002;110(1):15-21.
- Birnbaum, L. S. 1995. *Developmental Effects Of Dioxins*. Environ Health Perspect, Volume 103 (Suppl 7): 89-94.
- Bohonowych, J., M. Denison. 2004. Binding of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin to the AhR from various species is essentially irreversible. *Recent Advances In TCDD Toxicology,. Organohalogen Compounds*, Volume 66: 3338-3342.
- Boverhof, D.R., L. D. Burgoon, C. Tashiro, B. Chittim, J. R. Harkema, D. B. Jump,T.R. Zacharewski. 2005. Temporal and dose-dependent hepatic

- gene expression patterns in mice provide new insights into TCDD-mediated hepatotoxicity. *Toxicological sciences* 85:1048–1063.
- Brunner, H., J.R Cockcroft, J. Deanfield, A. Donald, E. Ferrannini, J. Halcox, W. Kiowski, T.F Luscher, G. Mancina and A. Natali. 2004. *Endothelial Function And Dysfunction. Factors Of The European Society of Hypertension. J Hypertens.* 23, 233–246.
- Ciftci, Osman., Murat, Olcay Disli and Timurkan, Necati. 2012. *Protective effects of protocatechuic acid on TCDD-induced oxidative and histopathological damage in the heart tissue of rats.* Toxicology and Industrial Health 29(9) 806-811. Department of Pharmaceutical Toxicology, University of Inonu, Turkey.
- Connel dan Miller. 1995. *Kimia dan Etoksikologi Pencemaran, diterjemahkan oleh Koestoer, S.,* hal. 419, Indonesia University Press, Jakarta.
- Contretas, M.M., R. Carro'n., M.J., Montero., M. Ramos and I. Recio. 2009. Novel Casein-Derived Peptides with Antihypertensive Activity. *International Dairy Journal* 19: 566-573.
- Contretas, M.M., M.A. Sevilla., J. Monroy-Ruiz., L. Amigo., B. Gomez-Sala., E. Molina., M. Ramos and I. Recio. 2011. Food-Grade Production of an Antihypertensive Casein Hydrolysate and Resistance of Active Peptides to Drying and Storage. *International Dairy Journal* 21 : 470-476.
- Davarinos, N.A., R. S. Pollenz. 1999. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 274, No. 40, Oct. 1: 28708–28715.
- Dawn BM, Allan DM, Colleen MS. *Metabolisme oksigen dan toksisitas oksigen.* In: Joko S, Vivi S, Lydia IM (editors). Biokimia kedokteran dasar: sebuah pendekatan klinis. Jakarta: EGC; 2000. Hlm. 321-9.
- Denison, M.S., S. Heath-Pagliuso. 1998. The Ah receptor: A regulator of the biochemical and toxicological action of structurally diverse chemicals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61: 557-568.
- De Medina, F. S., A. Daddaoua., P. Requena., F. Capitan-Canadas., A. Zarzuelo., M. D. Suarez and O. Marti'Nez-Agustin. 2010. *Food ingredients, immunity and inflammation: animal and in vitro models new insights into the immunological effects of food bioactive peptides in animal models of intestinal inflammation. Proceedings of the nutrition society* 69: 454-462.
- Doi, H., T. Baba, C. Tohyama and K. Nohara. 2003. *Functional Activation of Arylhydrocarbon receptor (Ahr) in primary T-cell by 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin.*
- EPA, 1997. Special Report on Environmental Endocrine Disruption: *An Effects Assessment.*

- EPA (Environment Protection Agency). (2003). *Evaluating atmospheric releases dioxin-like compounds from combustion sources*. Diambil 6 Februari 2006, dari [http://www.epa.gov/ncea/pdfs/dioxin/nasreview/pdfs/part1\\_vol3/dioxin\\_pt1\\_vol3\\_ch03\\_dec2003.pdf](http://www.epa.gov/ncea/pdfs/dioxin/nasreview/pdfs/part1_vol3/dioxin_pt1_vol3_ch03_dec2003.pdf).
- Fernandes-Checa JC, Kaplowits N. 2005. *Hepatic Mitochondrial Glutathione: Transport and Role in Disease and Toxicity*. Toxicol. Applied Pharm 2005; 204: 263-73.
- Fiedler, heidelore. 2001. *Dioksins and Furans* (PCDD/PCDF. Switzerland: UNEP Chemicals.
- Fournier, B.M. 2012. *The Role of Neutrophils During Intestinal Inflammation*. Epithelial Pathology Research Unit, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia:USA 5, 354-366; doi:10.1038/mi.2012.24
- Fujimaki, H.K. Nohara and T. Kobayashi. 2002. *Effect Of A Single Oral Dose Of 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-P-Dioksin On Immune Function In Male NC/Nga Mice*. Toxicology Science. 66(1) : 117-124.
- Gorman, S. & Tynan, E. (2003). Environment strategy notes: Persistent organics pollutants- a legacy of environmental harm and threats to health. No. 6 May 2003. Diambil 23 Februari 2004, dari <http://www.worldbank.org/pops>.
- Guyton & Hall. *Volume Paru. In: Fisiologi Kedokteran*. Ed 9th Penerbit Buku Kedokteran EGC Jakarta 1996; 604.
- Guyton AC, Hall JE. 1997. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi. Setiawan I, Tengadi KA, Santoso a, penerjemah*. Jakarta: EGC. Terjemahan dari: Textbook of Medical Physiology.
- Hendromartono S. *Peran Radikal Bebas terhadap Komplikasi Vaskuler*. Majalah Penyakit Dalam Udayana 2000;1:89-92.
- Hidayat, a., W. Christijanti., A. Marianti. 2013. Pengaruh Vitamin E terhadap Kadar SGPT dan SGOT Tikus Putih Galur Wistar yang Dipapar Timbal. *Unnes Journal Pangan dan Agroindustri*. 3(4) : 1412-1422.
- Hutahaean, S., S. Mangkoewidjojo, M. Sagi, and W. Asmara. 2009. *Induksi cacat cleft palate pada embrio mencit (Mus musculus, L) oleh 2,3,7,8-Tetrakloro-p-dioksin (TCDD)* (Dalam proses publikasi).
- Irramah, M.; Julizar; Irawati, L. 2017. *Pengaruh Uncaria Gambir Roxb Terhadap Ulkus Gaster dan Kadar Malondialdehida Hewan Coba yang Diinduksi Ethanol*. Majalah Kedokteran Andalas. Fakultas Kedokteran Andalas : Padang.
- Irawan, Rachmad H. W., Chanif Mahdi, Masdiana C. Padaga. 2014. *Pengaruh Pemberian Yoghurt Susu Kambing Sebagai Pencegahan Untuk Hiperkolestrolema Melalui Pengamatan Malondialdehida (MDA) Dan TNF- $\alpha$  Pada Jantung Hewan Model Tikus (Rattus norvegicus)*.



- Malang: Fakultas Kedokteran hewan dan Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.
- Jetawattana, S. 2005. Malondialdehida (MDA), A Lipid Oxidation Product : Free Radicals In Biology and Medicine. *Journal Biology Medicine*. Department of Radiation Oncology Free Radical and Radiation Biology. The University of Iowa for 77:222, Spring 2005 Iowa City, IA 52242-1181.
- Kitts, D and K. Weiler. 2003. Bioactive Protein and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses Used in Isolation and Recovery. *Current Pharmaceutical Design* 9 : 1309-1323.
- Korhonen, H and A. Pihlanto. 2006. *Bioactive Peptides: Production And Functionality*. *International dairy journal* 16: 945-960.
- Kullisaar, T., E. Songisepp., M. Mikelsaar., K. Zilmer., T. Vihalemm and M. Zilmer. 2003. Antioxidative Probiotic Fermented Goats Milk Decreases Oxidative-Stress-Mediated Atherogenicity in Human Subjects. *British Journal of Nutrition* 90:449-456.
- Kusumawati. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Landers, J.P., N.J. Bunce. 1991. The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity. *Biochem. J.* 276: 273-287.
- Liu, Je-Ruei, *et al.* *Antioxidative Activities Of Kefir*. *Asian-Aust J Anim Sci* 2005; Vol 18, No 4: 567-573.
- Luczaj, W. and S. Elzbieta. 2003. *DNA Damage Caused by Lipid Peroxidation Products*. *Cellular and Molecular Biologi Letter* 8: 391-413.
- Matsushita, M. (2003). Enabling facilities to facilitate early action on implementation of the Stochkolm Convention on organics pollutants (POPs) in Indonesia. *Makalah pada Workshop Sosialisasi Hasil Inventarisasi Bahan Kimia POPs di Indonesia*. Jakarta: Kementerian Lingkungan Hidup.
- Marika, I.K., L. Poellinger, J-A. Gustafsson. 1994. Regulation of human dioxin receptor function by indolecarbazole, receptor ligands of dietary origin. *J. Biol. Chem.* 269 (7): 5147-5154.
- Martin, P., and S.J. Leibovich. 2005. *Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad, and the ugly*. *Trends in Cells Biology* 15 (11): 599-607.
- Martunus dan Zuchra. 2007. Ekstraksi Dioksin dalam Limbah Air Buangan Industri Pulp dan Kertas dengan Pelarut Toluena. *Jurnal Sains dan Teknologi* Vol. 6 No. 1. Halaman 15.
- Mescher, L. A. (2009). *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas*. English: McGrawHill Medical.
- Miesel, Hans. 2005. Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current medicinal chemistry*, 12: 1905-1919.



- National Institute of Environmental Health Sciences. (2001). Dioxin research at the National Institute of Environmental Sciences (NIEHS). Diambil 4 Oktober 2004, dari <http://www.niehs.nih.gov/oc/factsheets/dioxin.htm>.
- Padaga, MC., Sawitri ME. & Muwarni S. 2009. *Potensi Protein Spesifik Susu Kambing Sebagai Immunomodulator Dan Immunogen: Upaya Pengembangan Pangan Nutrasetika*: Laporan Penelitian.
- Pauwels A, Schepens PJ, D'Hooghe T, Delbeke L, Dhont M, Brouwer A, Weyler J. *The Risk Of Endometriosis And Exposure To Dioxins And Polychlorinated Biphenyls: A Case-Control Study Of Infertile Women*. Hum Reprod 2001;16(10):2050-5.
- Pessione E., and C. Simona. 2016. Bioactive molecules released in food by Lactic Acid Bacteria : Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *Journal Frontiers in Microbiology*. Doi : 10.3389/fmicb.2016.D0876.
- Posecion, N. C., N. L. Crowe., A. R. Robinson and S. K. Asiedu. 2005. The development of goat's milk yoghurt. *Journal of science of food and agriculture* 85: 1909-1913.
- Price. S. A. dan L. M. Wilson. 2006. *Patofisiologi*. Ed 6. Jakarta: EGC.
- Pryor WA, Stanley JP, Blair E. 1976. *Autooxidation Of Polyunsaturated Fatty Acids: II. A Suggested Mechanism For The Formation Of TBA-Reactive Materials From Prostaglandin-Like Endoperoxides*. J Lipids 11(5): 370-9.
- Puspitasari, D.A. 2008. *Gambaran Histopatologi Lambung Tikus Putih (Rattus norvegicus) Akibat Pemberian Asam Asetil Salisilat*. Institut Pertanian Bogor.
- Rappe, C. (1996). *Sources and environmental concentrations of dioxins and related compounds*. Pure Appl Chem 68 (9), 1781-1789.
- Rier SE. *The Potential Role Of Exposure To Environmental Toxicants In The Pathophysiology Of Endometriosis*. Ann N Y Acad Sci 2002;955:201-12; discussion 30-2, 396-406.
- Rini, D. S. 2002. *Minimasi limbah dalam industri Pulp & paper*. Gresik: Ecological Observation And Welland Conservation.
- Riswanto, 2013. *Pemeriksaan Lab Hematologi*. Alfabedia and Kanal Medika, Yogyakarta.
- Sadikin, M. 2008. *Radikal Bebas Harus Dikendalikan*. Media Indonesia Hal. 17.
- Silvia, S.V and F.X. Malcata. 2005. *Casein as Source of Bioactive Peptides*. Escola Superior Iskemik Akut. [Tesis]. Program Pendidikan Dokter Spesialis I. Universitas Diponegoro : Semarang.
- Suryohudoyo P. *Oksidan, Antioksidan dan Radikal bebas*. Dalam: Ilmu Kedokteran Molekuler. Kapita Selekta. Jakarta: Sagung Seto. 2000.h. 31-46.
- Soedomo, Moestikahadi. (2001). *Pencemaran Udara*. Bandung: ITB.

- Soemarno, Sri.H. (1999). Diktat kuliah GM ITB: *Meteorologi Pencemaran Udara*. Bandung: ITB.
- Soemarwoto, O. (2004). *Atur diri sendiri, paradigma baru pengelolaan lingkungan hidup*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Suminar, S.A. (2003). *Estimasi emisi dioksin dan furan*. Hasil penelitian disampaikan pada Enabling Activities to Facilitate Early Action on the Implementation of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) in Indonesia. Workshop Hasil Inventarisasi POPs. UNIDO. Jakarta: Kementerian Lingkungan Hidup.
- Tambayong, J. 2000. *Patofisiologi untuk Keperawatan*. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- UNEP. (2003). *Standardized toolkit for identification and quantification of dioxin and furan releases*. Geneva-Switzerland: Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. Diambil 2 September 2004, dari [http://www.pops.int/documents/guidance/Toolkit\\_2003.pdf](http://www.pops.int/documents/guidance/Toolkit_2003.pdf).
- Walstra, P. 1999. Casein sub-micelles: do they exist?. *Int. Dairy J.*, 9: 189-192.
- Wati, Waode Karmila, Wurlina, Sarmanu. 2014. *Potensi Vitamin E Terhadap Jumlah Sel Spermatogenik Pada Mencit Yang Terpapar 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)*. Surabaya: jurnal Veterinaria medika vol 7 no 3.
- Yin, H.P., J.P. Xu, X.Q Zhou, and Y. Wang. 2012. *Effects Of Vitamin E On Reproductive Hormones And Testis Structure In Chronic Dioksin-Treated Mice*. *Toxicology and Industrial*.
- Yoshida, R., and Y. Ogawa. 2000. *Oxidative Stress Induced by 2,3,7,8-TCDD: An Application of Oxidative Stress Markers to Cancer Risk Assessment of Dioxins*. *Indust. Health. Journal*. 38: 5-14.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 710-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : PEMANFAATAN NUTRASETIKA ALAMI BERBASIS  
BIOAKTIF ANTIOKSIDAN PEPTIDE KASEIN YOGHURT  
SUSU KAMBING UNTUK PENANGANAN KERACUNAN  
DIOKSIDIN PADA TIKUS JANTAN (*Rattus norvegicus*)

PENELITI : AJENG ERIKA PRIHASTUTI HASKITO  
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 8 Maret 2017  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya

  
Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.  
NIP. 19600903 198802 2 001



**Lampiran 2.** Surat Pernyataan Payung Penelitian

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Muhammad Habibie Robbie

NIM :145130107111002

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Fakultas : Kedokteran Hewan

Universitas : Brawijaya

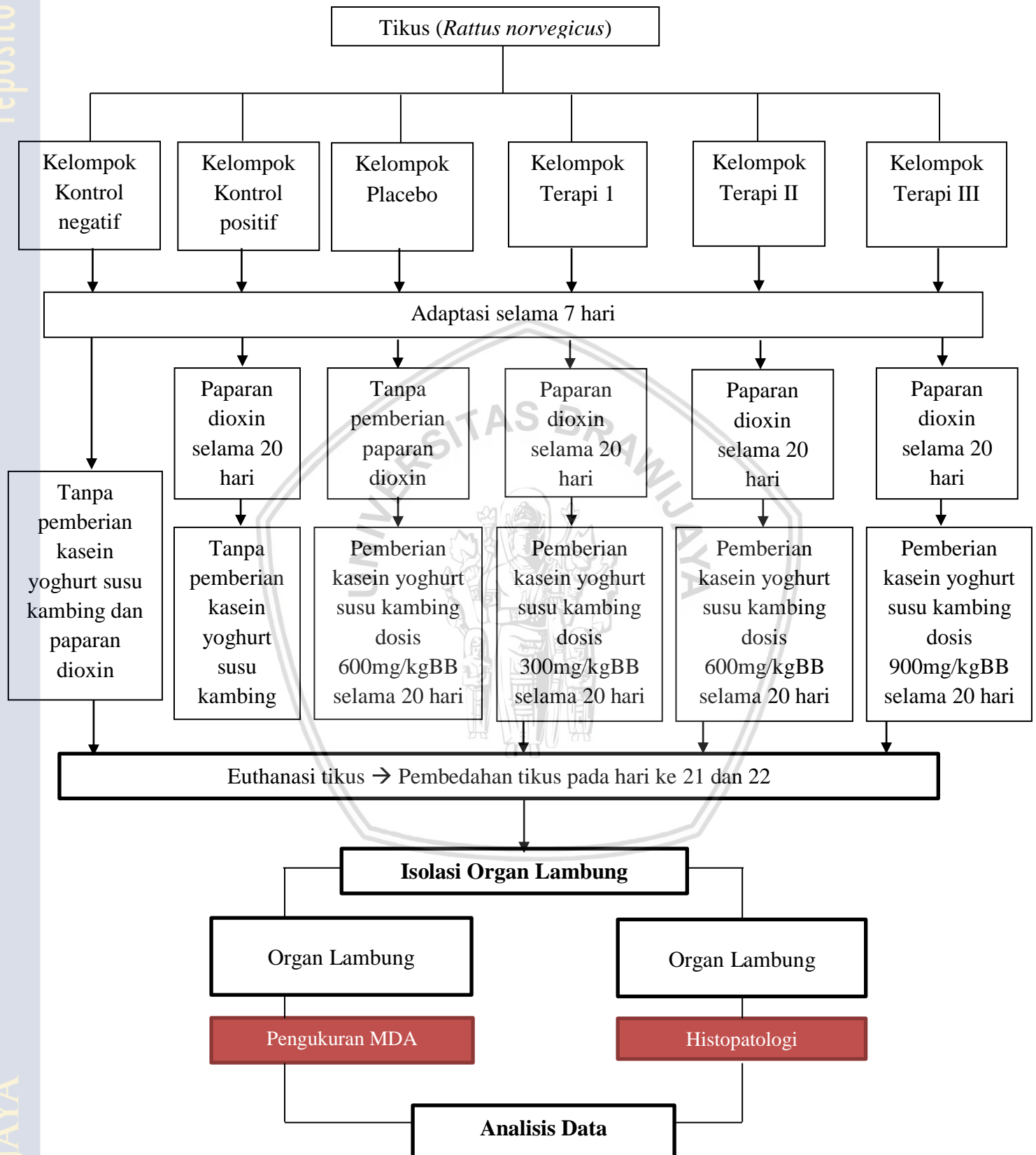
Menyatakan bahwa penelitian saya yang berjudul “Efek Preventif Kasein Yoghurt Susu Kambing terhadap Kadar *Malondialdehida* (MDA) dan Gambaran Histopatologi Lambung Tikus putih (*Ratus novergicus*) yang Dipapar 2,3,7,8-*tetrachlorinedibenzo-p-dioksin* (TCDD)” merupakan bagian dari penelitian yang berjudul “Pemanfaatan Nurasetika Alami berbasis Bioaktif Antioksidan Peptida Kasein Yoghurt Susu Kambing Untuk Penanganan Keracunan Dioksin”. Untuk itu kepemilikan dan hak publikasi menjadi hak milik dari peneliti utama Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS.

Malang, 18 Oktober 2017

Yang membuat pernyataan

**Muh. Habibie Robbie**  
NIM. 145130107111002

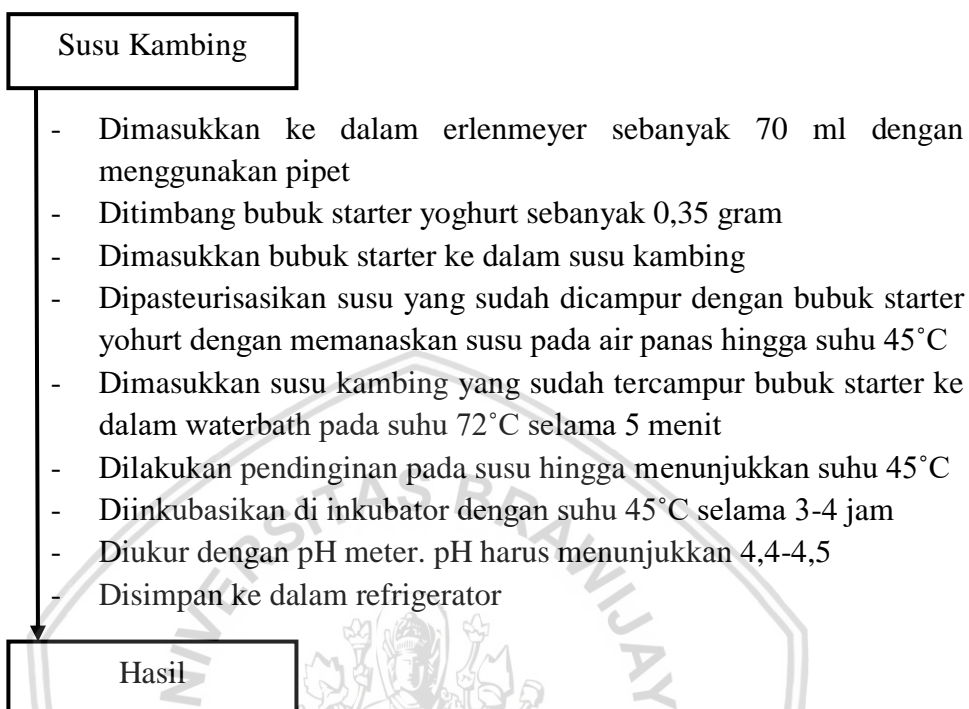
### Lampiran 3. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian



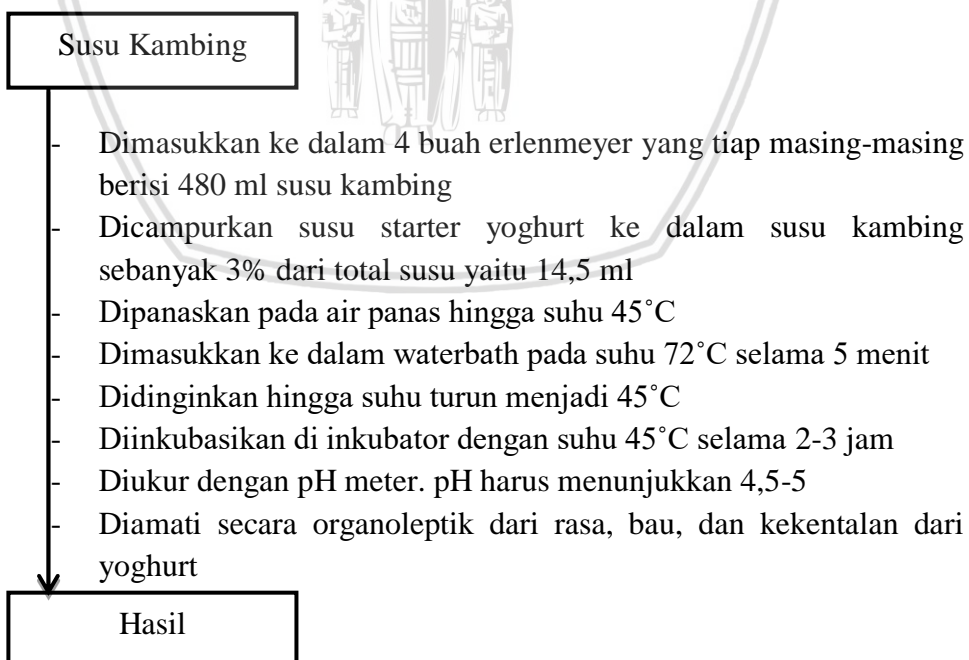


## Lampiran 4. Pembuatan Yoghurt Susu Kambing

### A. Pembuatan Starter

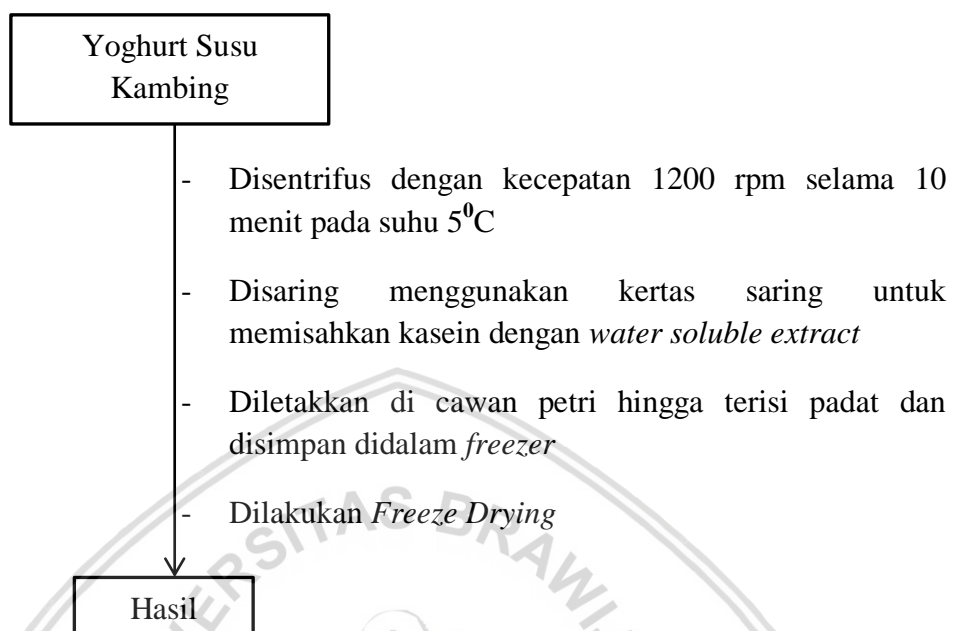


### B. Pembuatan Yoghurt





### C. Pembuatan Kasein Yoghurt Susu Kambing



### Lampiran 5. Perhitungan Dosis Kasein Yoghurt Susu Kambing

Pemberian dosis kasein yoghurt susu kambing dibagi menjadi 3, yaitu dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB.

**Tabel 4.1** Perhitungan Dosis Pemberian kasein

Hari ke-	N	Kelompok 1 (terapi kasein 300 mg/kg BB)		Kelompok 2 dan placebo (terapi kasein 600 mg/kg BB)		Kelompok 3 (terapi kasein 900 mg/kg BB)	
		BB (kg)	Hasil (mg)	BB (kg)	Hasil (mg)	BB (kg)	Hasil (mg)
1	4	178,2	53,46	164,4	98,64	169,6	152,64
2	4	178,2	53,46	164,4	98,64	169,6	152,64
3	4	178,2	53,46	164,4	98,64	169,6	152,64
4	4	178,2	53,46	164,4	98,64	169,6	152,64
5	4	178,2	53,46	164,4	98,64	169,6	152,64
6	4	178,2	53,46	164,4	98,64	169,6	152,64
7	4	178,2	53,46	164,4	98,64	169,6	152,64
8	4	189,9	56,97	181,4	108,84	185,5	166,95
9	4	189,9	56,97	181,4	108,84	185,5	166,95
10	4	189,9	56,97	181,4	108,84	185,5	166,95
11	4	189,9	56,97	181,4	108,84	185,5	166,95
12	4	189,9	56,97	181,4	108,84	185,5	166,95
13	4	189,9	56,97	181,4	108,84	185,5	166,95
14	4	189,9	56,97	181,4	108,84	185,5	166,95
15	4	205	61,5	200	120	206	185,4
16	4	205	61,5	200	120	206	185,4
17	4	205	61,5	200	120	206	185,4
18	4	205	61,5	200	120	206	185,4
19	4	205	61,5	200	120	206	185,4
20	4	205	61,5	200	120	206	185,4
21	4	205	61,5	200	120	206	185,4

Contoh perhitungan dosis pemberian kasein dengan dosis 300 mg/kg BB :

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 1

(rata-rata berat badan = 116 gram)  $\rightarrow \frac{116 \text{ gr}}{1000} \times 300 \text{ mg} = 34,8 \text{ mg}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 2

(rata-rata berat badan = 130 gram)  $\rightarrow \frac{130 \text{ gr}}{1000} \times 300 \text{ mg} = 39 \text{ mg}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 3

(rata-rata berat badan = 133 gram)  $\rightarrow \frac{133 \text{ gr}}{1000} \times 300 \text{ mg} = 39,9 \text{ mg}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 4

(rata-rata berat badan = 139 gram)  $\rightarrow \frac{139 \text{ gr}}{1000} \times 300 \text{ mg} = 41,7 \text{ mg}$

---

<b>Total</b>	<b>= 518 gram</b>	<b>= 155,4 mg</b>
<b>Rata-rata</b>	<b>= 129,5 gram</b>	<b>= 38,85 mg</b>

Kasein dilarutkan dengan air RO sebanyak 1 ml

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 1

(rata-rata berat badan = 116 gram)  $\rightarrow \frac{34,8 \text{ mg}}{38,85 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,895 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 2

(rata-rata berat badan = 130 gram)  $\rightarrow \frac{39 \text{ mg}}{38,85 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 3

(rata-rata berat badan = 133 gram)  $\rightarrow \frac{39,9 \text{ mg}}{38,85 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1,03 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 4

(rata-rata berat badan = 139 gram)  $\rightarrow \frac{41,7 \text{ mg}}{38,85 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1,073 \text{ ml}$

---

**Total** **= 3,998 ml**

- Dalam 3,998 ml air RO terdapat 155,4 mg kasein
- Dalam prosedur penelitian yang kami siapkan setiap kelompok dalam satu minggu :  $3,998 \times 7 = 27,986 \text{ ml}$
- Untuk 27,986 ml larutan, maka kasein yang dibutuhkan :

$$\frac{27,986 \text{ ml}}{3,998 \text{ ml}} \times 155,4 \text{ mg} = 1087,8 \text{ mg} = 1,08 \text{ gr kasein}$$

Contoh perhitungan dosis pemberian kasein dengan dosis 600 mg/kg BB :

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 1

(rata-rata berat badan = 145 gram)  $\rightarrow \frac{145 \text{ gr}}{1000} \times 600 \text{ mg} = 87 \text{ mg}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 2

(rata-rata berat badan = 138 gram) →  $\frac{138 \text{ gr}}{1000} \times 600 \text{ mg} = 78 \text{ mg}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 3

(rata-rata berat badan = 146 gram) →  $\frac{146 \text{ gr}}{1000} \times 600 \text{ mg} = 79,8 \text{ mg}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 4

(rata-rata berat badan = 150 gram) →  $\frac{150 \text{ gr}}{1000} \times 600 \text{ mg} = 90 \text{ mg}$

---

<b>Total</b>	<b>= 579 gram</b>	<b>= 334,8 mg</b>
<b>Rata-rata</b>	<b>= 144,75 gram</b>	<b>= 83,7 mg</b>

Kasein dilarutkan dengan air RO sebanyak 1 ml

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 1

(rata-rata berat badan = 145 gram) →  $\frac{87 \text{ gr}}{83,7 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1,04 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 2

(rata-rata berat badan = 138 gram) →  $\frac{78 \text{ gr}}{83,7 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,93 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 3

(rata-rata berat badan = 146 gram) →  $\frac{79,8 \text{ gr}}{83,7 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,95 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 4

(rata-rata berat badan = 150 gram) →  $\frac{90 \text{ gr}}{83,7 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1,08 \text{ ml}$

---

**Total** = 4 ml

- Dalam 4 ml air RO terdapat 334,8 mg kasein
- Dalam prosedur penelitian yang kami siapkan setiap kelompok dalam satu minggu :  $4 \times 7 = 28 \text{ ml}$
- Untuk 28 ml larutan, maka kasein yang dibutuhkan :

$$\frac{28 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 334,8 \text{ mg} = 2.343,6 \text{ mg} = 2,34 \text{ gr kasein}$$

Contoh perhitungan dosis pemberian kasein dengan dosis 900 mg/kg BB :

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 1

(rata-rata berat badan = 188 gram)  $\rightarrow \frac{188 \text{ gr}}{1000} \times 900 \text{ mg} = 169,2 \text{ mg}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 2

(rata-rata berat badan = 174 gram)  $\rightarrow \frac{174 \text{ gr}}{1000} \times 900 \text{ mg} = 156,6 \text{ mg}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 3

(rata-rata berat badan = 158 gram)  $\rightarrow \frac{158 \text{ gr}}{1000} \times 900 \text{ mg} = 142,2 \text{ mg}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 4

(rata-rata berat badan = 162 gram)  $\rightarrow \frac{162 \text{ gr}}{1000} \times 900 \text{ mg} = 145,8 \text{ mg}$

---

<b>Total</b>	<b>= 682 gram</b>	<b>= 613,8 mg</b>
<b>Rata-rata</b>	<b>= 170,5 gram</b>	<b>= 153,45 mg</b>

Kasein dilarutkan dengan air RO sebanyak 1 ml

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 1

(rata-rata berat badan = 188 gram)  $\rightarrow \frac{169,2 \text{ gr}}{153,45 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1,1 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 2

(rata-rata berat badan = 174 gram)  $\rightarrow \frac{156,6 \text{ gr}}{153,45 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1,02 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 3

(rata-rata berat badan = 158 gram)  $\rightarrow \frac{142,2 \text{ gr}}{153,45 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,93 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 4

(rata-rata berat badan = 162 gram)  $\rightarrow \frac{145,8 \text{ gr}}{153,45 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,95 \text{ ml}$

---

**Total** **= 4 ml**

- Dalam 4 ml air RO terdapat 613,8 mg kasein
- Dalam prosedur penelitian yang kami siapkan setiap kelompok dalam satu minggu :  $4 \times 7 = 28 \text{ ml}$
- Untuk 28 ml larutan, maka kasein yang dibutuhkan :

$\frac{28 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 613,8 \text{ mg} = 4.296,6 \text{ mg} = 4,3 \text{ gr kasein}$

### Lampiran 6. Perhitungan Dosis 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)

Perhitungan pengenceran TCDD dalam minyak jagung

TCDD dalam kemasan ampul  $\Rightarrow$  10  $\mu\text{g/ml}$   $\rightarrow$  10.000 ng/ml

Dosis yang dibutuhkan untuk penelitian 100 ng/ml dalam 100 ml minyak jagung

Maka, perhitungannya :  $10 \mu\text{g} / 1 \text{ ml} \longrightarrow 10.000 \text{ ng} / 1 \text{ ml}$

$1 \mu\text{g} / 0,1 \text{ ml} \longrightarrow 1.000 \text{ ng} / 10 \text{ ml}$

$0,1 \mu\text{g} / 0,01 \text{ ml} \longrightarrow 100 \text{ ng} / 100 \text{ ml}$

Jika yang dibutuhkan TCDD dalam 100 ml minyak jagung adalah 100 ng, maka

TCDD yang diambil dalam ampul menggunakan mikropipet sebanyak 0,01 ml

Pemberian dosis dioksin 100 ng/kg BB

Hari ke-	N	Kelompok 1 (dioksin 100 ng/kg BB)		Kelompok 2 dan placebo (terapi kasein 100 ng/kg BB)		Kelompok 3 (dioksin 100 ng/kg BB)	
		BB (kg)	Hasil (ng)	BB (kg)	Hasil (ng)	BB (kg)	Hasil (ng)
1	4	178,2	0,01782	164,4	0,01644	169,6	0,01696
2	4	178,2	0,01782	164,4	0,01644	169,6	0,01696
3	4	178,2	0,01782	164,4	0,01644	169,6	0,01696
4	4	178,2	0,01782	164,4	0,01644	169,6	0,01696
5	4	178,2	0,01782	164,4	0,01644	169,6	0,01696
6	4	178,2	0,01782	164,4	0,01644	169,6	0,01696
7	4	178,2	0,01782	164,4	0,01644	169,6	0,01696
8	4	189,9	0,01899	181,4	0,01814	185,5	0,01855
9	4	189,9	0,01899	181,4	0,01814	185,5	0,01855
10	4	189,9	0,01899	181,4	0,01814	185,5	0,01855
11	4	189,9	0,01899	181,4	0,01814	185,5	0,01855
12	4	189,9	0,01899	181,4	0,01814	185,5	0,01855
13	4	189,9	0,01899	181,4	0,01814	185,5	0,01855
14	4	189,9	0,01899	181,4	0,01814	185,5	0,01855
15	4	205	0,0205	200	0,02	206	0,0206
16	4	205	0,0205	200	0,02	206	0,0206
17	4	205	0,0205	200	0,02	206	0,0206
18	4	205	0,0205	200	0,02	206	0,0206
19	4	205	0,0205	200	0,02	206	0,0206
20	4	205	0,0205	200	0,02	206	0,0206
21	4	205	0,0205	200	0,02	206	0,0206



## Perhitungan Dosis TCDD

Contoh perhitungan dosis pemberian TCDD dengan dosis 100 ng/kg BB :

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 1

(rata-rata berat badan = 116 gram)  $\rightarrow \frac{116 \text{ gr}}{1000} \times 100 \text{ ng} = 11,6 \text{ ng}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 2

(rata-rata berat badan = 130 gram)  $\rightarrow \frac{130 \text{ gr}}{1000} \times 100 \text{ ng} = 13 \text{ ng}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 3

(rata-rata berat badan = 133 gram)  $\rightarrow \frac{133 \text{ gr}}{1000} \times 100 \text{ ng} = 13,3 \text{ ng}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 4

(rata-rata berat badan = 139 gram)  $\rightarrow \frac{139 \text{ gr}}{1000} \times 100 \text{ ng} = 13,9 \text{ ng}$

---

<b>Total</b>	<b>= 518 gram</b>	<b>= 51,8 ng</b>
<b>Rata-rata</b>	<b>= 129,5 gram</b>	<b>= 12,95 ng</b>

TCDD dilarutkan dengan corn oil sebanyak 1 ml

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 1

(rata-rata berat badan = 116 gram)  $\rightarrow \frac{11,6 \text{ ng}}{12,95 \text{ ng}} \times 1 \text{ ml} = 0,9 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 2

(rata-rata berat badan = 130 gram)  $\rightarrow \frac{13 \text{ ng}}{12,95 \text{ ng}} \times 1 \text{ ml} = 1 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 3

(rata-rata berat badan = 133 gram)  $\rightarrow \frac{13,3 \text{ ng}}{12,95 \text{ ng}} \times 1 \text{ ml} = 1,02 \text{ ml}$

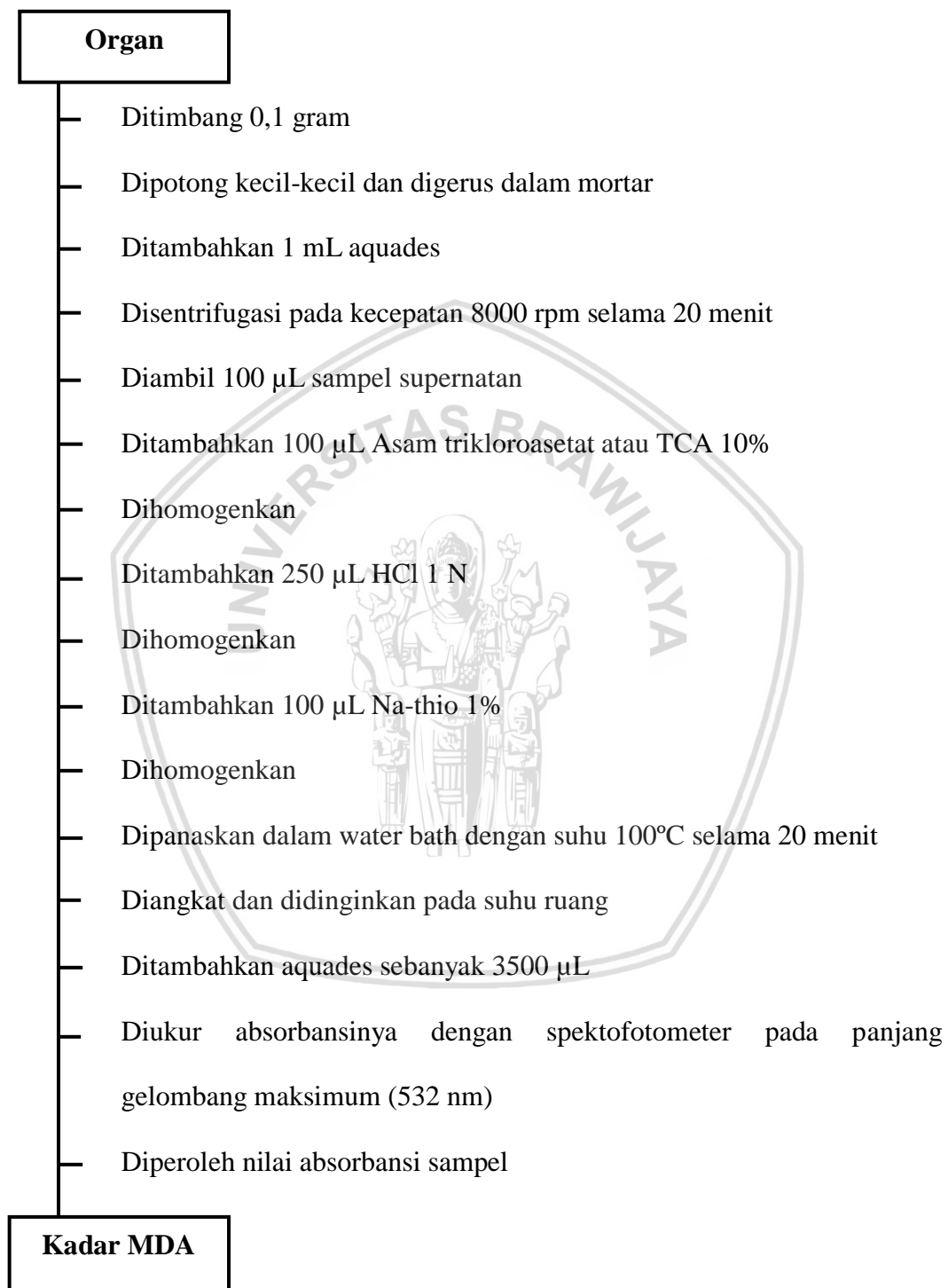
Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 4

(rata-rata berat badan = 139 gram)  $\rightarrow \frac{13,9 \text{ ng}}{12,95 \text{ ng}} \times 1 \text{ ml} = 1,07 \text{ ml}$

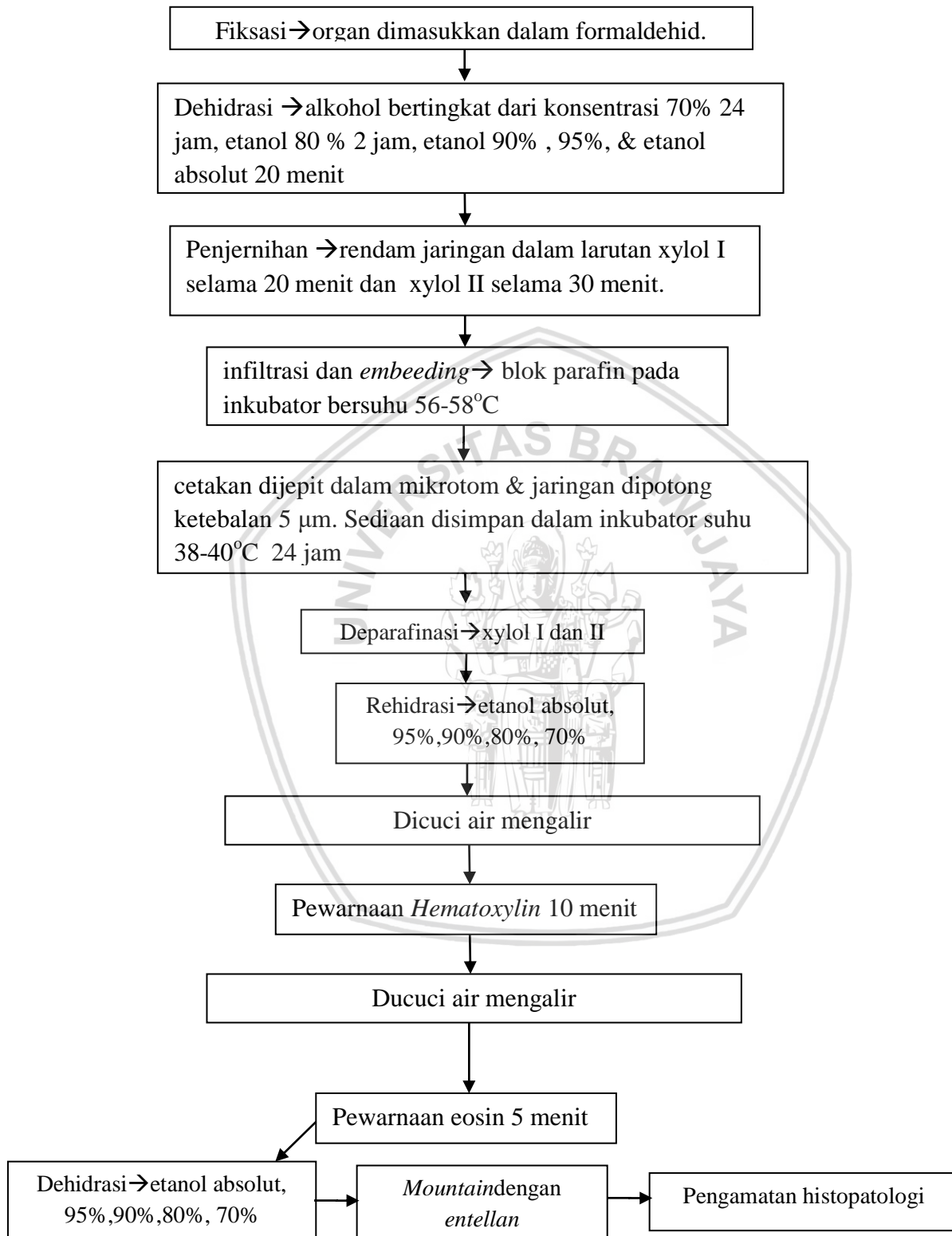
---

**Total** **= 3,99 ml**

- Dalam 3,99 ml corn oil terdapat 51,8 ng Dioxin
- Dalam prosedur penelitian yang kami siapkan setiap kelompok larutan Dioxin dalam seminggu  $3,99 \times 7 = 27,93 \text{ ml}$
- Untuk 27,93 ml larutan, maka Dioxin yang dibutuhkan  $\frac{27,93 \text{ ml}}{3,99 \text{ ml}} \times 51,8 \text{ ng} = 362,6 \text{ ng}$

**Lampiran 7.** Prosedur Pemeriksaan Kadar Malondialdehida (MDA)

**Lampiran 8.** Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE)



**Lampiran 9.** Data Absorbansi dan Perhitungan Kadar MDA Organ Lambung

<b>Perlakuan</b>	<b>Ulangan</b>	<b>Absorbansi (A)</b>	<b>Kadar (ng/ml)</b>	<b>Rata-Rata</b>	<b>SD</b>
Kontrol –	1	0,677	1724	1644,5	89,09
	2	0,675	1719		
	3	0,612	1561		
	4	0,617	1574		
Kontrol Kasein	1	0,600	1531,5	1588,375	76,63
	2	0,602	1536,5		
	3	0,623	1589		
	4	0,666	1696,5		
Kontrol +	1	0,824	2091,5	1928,175	116,11
	2	0,760	1931,5		
	3	0,726	1846,5		
	4	0,725	1844,5		
Perlakuan 1	1	0,749	1904	1857,75	97,01
	2	0,768	1951,5		
	3	0,727	1849		
	4	0,678	1726,5		
Perlakuan 2	1	0,736	1821,5	1715,125	77,45
	2	0,710	1706,5		
	3	0,642	1636		
	4	0,686	1696,5		
Perlakuan 3	1	0,695	1769	1685,25	80,35
	2	0,683	1739		
	3	0,635	1619		
	4	0,633	1614		

# **Lampiran 10. Data Hasil dan Uji Statistika Kadar Malondialdehida (MDA)**

## **One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Kadar
N		24
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	1736.5625
	Std. Deviation	145.58639
Most Extreme Differences	Absolute	.118
	Positive	.118
	Negative	-.079
Test Statistic		.118
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200 <sup>c,d</sup>

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

## **Descriptives**

Kadar

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	4	1644.5000	89.09358	44.54679	1502.7322	1786.2678	1561.00	1724.00
P1	4	1857.7500	97.00730	48.50365	1703.3897	2012.1103	1726.50	1951.50
P2	4	1715.1250	77.45469	38.72735	1591.8773	1838.3727	1636.00	1821.50
P3	4	1685.2500	80.35079	40.17540	1557.3940	1813.1060	1614.00	1769.00
KP	4	1588.3750	76.63156	38.31578	1466.4371	1710.3129	1531.50	1696.50
K+	4	1928.3750	116.10654	58.05327	1743.6236	2113.1264	1844.00	2091.50
Total	24	1736.5625	145.58639	29.71770	1675.0868	1798.0382	1531.50	2091.50

## **Test of Homogeneity of Variances**

Kadar

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.300	5	18	.906

## **ANOVA**

Kadar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	340024.094	5	68004.819	8.301	.000
Within Groups	147470.063	18	8192.781		
Total	487494.156	23			

## Post Hoc Test

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	P1	-213.25000 <sup>*</sup>	64.00305	.037	-416.6539	-9.8461
	P2	-70.62500	64.00305	.874	-274.0289	132.7789
	P3	-40.75000	64.00305	.987	-244.1539	162.6539
	KP	56.12500	64.00305	.947	-147.2789	259.5289
	K+	-283.87500 <sup>*</sup>	64.00305	.004	-487.2789	-80.4711
P1	K-	213.25000 <sup>*</sup>	64.00305	.037	9.8461	416.6539
	P2	142.62500	64.00305	.273	-60.7789	346.0289
	P3	172.50000	64.00305	.125	-30.9039	375.9039
	KP	269.37500 <sup>*</sup>	64.00305	.006	65.9711	472.7789
	K+	-70.62500	64.00305	.874	-274.0289	132.7789
P2	K-	70.62500	64.00305	.874	-132.7789	274.0289
	P1	-142.62500	64.00305	.273	-346.0289	60.7789
	P3	29.87500	64.00305	.997	-173.5289	233.2789
	KP	126.75000	64.00305	.390	-76.6539	330.1539
	K+	-213.25000 <sup>*</sup>	64.00305	.037	-416.6539	-9.8461
P3	K-	40.75000	64.00305	.987	-162.6539	244.1539
	P1	-172.50000	64.00305	.125	-375.9039	30.9039
	P2	-29.87500	64.00305	.997	-233.2789	173.5289
	KP	96.87500	64.00305	.661	-106.5289	300.2789
	K+	-243.12500 <sup>*</sup>	64.00305	.014	-446.5289	-39.7211
KP	K-	-56.12500	64.00305	.947	-259.5289	147.2789
	P1	-269.37500 <sup>*</sup>	64.00305	.006	-472.7789	-65.9711
	P2	-126.75000	64.00305	.390	-330.1539	76.6539
	P3	-96.87500	64.00305	.661	-300.2789	106.5289
	K+	-340.00000 <sup>*</sup>	64.00305	.001	-543.4039	-136.5961
K+	K-	283.87500 <sup>*</sup>	64.00305	.004	80.4711	487.2789
	P1	70.62500	64.00305	.874	-132.7789	274.0289
	P2	213.25000 <sup>*</sup>	64.00305	.037	9.8461	416.6539
	P3	243.12500 <sup>*</sup>	64.00305	.014	39.7211	446.5289
	KP	340.00000 <sup>*</sup>	64.00305	.001	136.5961	543.4039

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



## Homogenous Subsets

### Kadar

Tukey HSD<sup>a</sup>

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
KP	4	1588.3750		
K-	4	1644.5000		
P3	4	1685.2500	1685.2500	
P2	4	1715.1250	1715.1250	
P1	4		1857.7500	1857.7500
K+	4			1928.3750
Sig.		.390	.125	.874

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

